



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DOS NITRITOS INORGÂNICOS
NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES UMA NOVA FUNÇÃO
PARA O VELHO CONHECIDO**

Trabalho submetido por
Miguel Silveira Machado e Bairrão de Sousa
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DOS NITRITOS INORGÂNICOS EM
DOENÇAS CARDIOVASCULARES UMA NOVA FUNÇÃO PARA O
VELHO CONHECIDO**

Trabalho submetido por
Miguel Silveira Machado e Bairrão de Sousa
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Gabriela Almeida

novembro de 2015

Dedicatória

Gostaria de dedicar este trabalho, à minha mãe Helena Silveira Machado

Bem como aos meus irmãos Mariana e João Paulo

Por me terem permitido e ajudado a ser quem sou!

Agradecimentos

Com os meus sinceros agradecimentos à prof. Doutora Gabriela Almeida, por se ter mostrado incansável na procura dos meus melhores resultados, bem como me ter proporcionado estudar e dar a conhecer um tema, que não era do meu conhecimento, mas que se manifestou deslumbrante ao longo do seu desenvolvimento. Obrigado por me dar a conhecer os nitritos inorgânicos e me ter feito consciente dos seus potenciais terapêuticos.

De igual forma não posso deixar de agradecer a todos os professores que contribuíram para a minha formação académica, pela sua instrução, exigência e disponibilidade. Por me proporcionarem as “ferramentas” essenciais ao desempenho digno da minha função profissional. Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, pela disponibilização de materiais, equipamentos, espaço e ambiente adequados ao bom ensinamento do curso de Ciências Farmacêuticas.

Neste ambiente, quero ainda agradecer a todos os meus bons amigos que me acompanharam antes e ao longo da minha vida académica, pela sua constante presença nos melhores e piores momentos, por todas as alegrias, ajuda e ensinamentos que me concederam. Fizeram-me crescer em muitos sentidos e permitiram conhecer-me a mim próprio de maneiras que mais ninguém poderia, em particular à Catarina Cardoso e Marta Mendes pela grande ajuda concedida nas formatações.

Por último e não com menor importância agradeço à minha família, que me concedeu incansavelmente todo o ambiente adequado ao meu crescimento. Em especial à minha mãe e irmãos, que ao contrário de todas as variáveis se mantiveram constantes. Por me possibilitarem adquirir uma formação profissional, e principalmente por me darem a conhecer a felicidade.

Resumo

A descoberta do importante papel do óxido nítrico (NO), na fisiologia e biologia humana, marcou uma viragem crucial no entendimento do funcionamento das patologias cardiovasculares, assim como a sua etiologia. Hoje sabe-se que a redução de NO biodisponível no organismo, está na base do desenvolvimento de condições patológicas principalmente ao nível cardiovascular.

Durante muito tempo, os nitritos inorgânicos têm vindo a ser considerados produtos resultantes do metabolismo do NO, prejudiciais à saúde e inúteis do ponto de vista clínico. No entanto, a revelação recente de que os nitritos podem ser reduzidos *in vivo* e dar origem a NO, conduziu à revisão do seu valor fisiológico e terapêutico. Ao contrário da via de síntese clássica de NO que é dependente de oxigénio, as vias de redução dos nitratos e nitritos conseguem assegurar a sua biodisponibilidade, em condições fisiopatológicas caracterizadas pela redução dos níveis de oxigénio ou redução do pH.

A dieta também pode representar uma importante fonte de nitratos e nitritos inorgânicos, que por sua vez conferem efeitos benéficos á saúde cardiovascular, nomeadamente na redução da hipertensão e aterosclerose, bem como na citoproteção em lesões isquémicas. Porém também é de evidenciar que estes compostos podem manifestar-se úteis como método de diagnóstico e identificação de estados fisiopatológicos, na medida que ao contrário do NO, estes conseguem ser detetáveis biologicamente, e simultaneamente refletir a sua biodisponibilidade.

Com base neste contexto, esta revisão visa recolher informação atualizada, relativa ao emergente potencial terapêutico do nitrito em doenças cardiovasculares. Numa tentativa de avaliar os obstáculos, inerentes à futura aplicação terapêutica destes compostos, também se procedeu à compilação de informação relativa à sua toxicidade bem como as suas possíveis formulações.

Palavras-chave: Nitrito inorgânico; Biomarcador; Terapêutica de Doenças Cardiovasculares; Via Nitrato-Nitrito-Óxido Nítrico;

Abstract

The discovery of the important role of nitric oxide (NO) in human's physiology and biology marked a determinant turn in our understanding concerning the etiology of cardiovascular diseases and how does it affects us. Today it's known that the reduction of NO's bioavailability in organism, is the basis for the development of pathologic conditions, primarily in the cardiovascular system.

For a long time inorganic nitrites had been considered products of NO metabolism harmful to health and useless in a clinical point of view. However the recent revelation that nitrite may be reduced *in vivo* and generate NO, led to the review of its physiological and therapeutic value. Unlike classical NO pathway of synthesis, these nitrate and nitrite's reduction routes can ensure NO bioavailability, particularly in physiopathological conditions characterized by reduced oxygen levels or pH lowering.

The diet may also represent a major source of inorganic nitrates and nitrites which provide beneficial effects on cardiovascular health, as like reducing hypertension and atherosclerosis, as well as mediating cytoprotection on ischemic injury. In the other hand it is also evident that nitrites can manifest useful as a method of diagnosis and identification of pathophysiological states. Unlike NO these compounds can be biologically detectable, and simultaneously reflect its bioavailability.

Within this context this review aims to gather updated information on the emerging therapeutic potential of nitrite in cardiovascular disease. In order to evaluate the inherent obstacles to the future therapeutic application of these compounds, it was also proceeded to the compilation of information about its toxicity and its possible formulations.

Key-Words: Inorganic Nitrite; Biomarker; Cardiovascular Diseases Therapeutic; Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway;

Índice

1. Introdução	21
2. Óxido nítrico.....	21
2.1- Biossíntese e metabolismo.....	21
2.1.1- Via clássica (NOS) - Sintase do óxido nítrico	21
2.1.2- Via nitrato-nitrito-óxido nítrico	26
2.2 – Biorelação entre óxido nítrico (NO) e nitrito (NO ₂ ⁻)	32
3. Nitritos inorgânicos	35
3.1-Fontes exógenas.....	35
3.2 - Fontes endógenas.....	38
3.1.1- Redução do nitrato salivar por bactérias comensais	38
3.1.2- Oxidação do óxido nítrico (NO) endógeno.....	40
3.1.3- Redução do nitrato pela xantina oxiredutase (XOR)	40
3.3- Nitratos e nitritos inorgânicos vs. Nitratos orgânicos.....	41
3.4- Nitrito - marcador biológico e método de diagnóstico de fisiopatologias.....	42
4. Potencial terapêutico do nitrito inorgânico.....	47
4.1- Potenciais aplicações terapêuticas em patologias cardiovasculares	48
4.1.1- Hipertensão	48
4.1.2 - Citoproteção em lesões de reperfusão isquêmica	53
4.1.3 - Doença arterial periférica (DAP)	57
4.2 - Formulações do nitrito e vias de administração	58
4.3 - Toxicidade e efeitos adversos dos nitritos	59
5. Conclusão	59
6. Perspetivas futuras.....	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Local da biossíntese e função fisiológica do óxido nítrico. Traduzido de: (Förstermann & Sessa, 2012)	22
Figura 2 - Estrutura e regulação da sintase do óxido nítrico (NOS). Traduzido e adaptado de: (Förstermann & Sessa, 2012)	23
Figura 3 - Via nitrato-nitrito-óxido nítrico. Traduzido e adaptado de: (Kapil et al., 2014)	27
Figura 4 - Função e metabolização do nitrito e óxido nítrico pela hemoglobina em diferentes tensões de oxigênio adaptado e traduzido de: (Dejam et al., 2004).....	29
Figura 5 - Ciclo do nitrato, nitrito e óxido nítrico no mamífero. Traduzido e adaptado de: (Lundberg et al., 2009)	33
Figura 6 - Ciclo do nitrato, nitrito e óxido nítrico no mamífero. Traduzido e adaptado de: (Lundberg et al., 2009)	37
Figura 7 - Redução do nitrato salivar por bactérias da flora oral. Adaptado e traduzido de: (Kevil et al., 2011)	39
Figura 8 - Amostra de nitrito salivar como marcador da biodisponibilidade de NO. Adaptado e traduzido de: (Bryan, 2015)	44
Figura 9 - Potencial terapêutico do nitrito inorgânico. Adaptado e traduzido de: (Kevil et al., 2011)	47
Figura 10 A - Influência do nitrito no aumento do fluxo sanguíneo B- Influencia da NOS e do exercício físico, na vasodilatação mediada pelo nitrito. Adaptado e traduzido de: (Cosby et al., 2003; Gladwin et al., 2006)	50
Figura 11 - Ação citoprotetora do óxido nítrico e do nitrito na mitocôndria comparativamente á hipoxia. Adaptado de (Lundberg et al., 2009).....	55

Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Tempos de semivida dos nitratos, nitritos e óxido nítrico no plasma. Traduzido e adaptado de: (Hord et al., 2009)	33
Tabela 2- Teores de nitritos e nitratos nos frutícolas, hortícolas e carnes curadas. Traduzido e adaptado de (Hord et al., 2009)	36
Tabela 3- categorização dos vegetais de acordo com os teores de nitratos. Traduzido e adaptado de: (Hord et al., 2009)	37

Lista de abreviaturas:

(NO₃⁻) - Nitrato

(NO₂⁻) - Nitrito

(NO) – Óxido Nítrico

(NOS) - Óxido Nítrico Sintase

(O₂) – Oxigénio

(nNOS) – Óxido nítrico Sintase neural

(iNOS) – Óxido nítrico sintase induzida

(eNOS) – Óxido nítrico sintase endotelial

(NADPH) – Dinucleótido de nicotinamina-adenina fosfatada e reduzida

(BH₄) – Tetrahydro L-biopterina

(caM) – Camuludina

(nM) – Nanomolar

(GMP) – Guanosina monofosfato

(RNS) – Espécies reativas do nitrogénio

(OxiHb) – Oxihemoglobina

(MetHb) – Metahemoglobina

(DesoxiHb) – Desoxihemoglobina

(DesoxiMb) – Desoximioglobina

(HNO₂) – Ácido nitroso

(N₂O₃) – Trióxido de di-nitrogénio

(XOR) – Xantina oxiredutase

(ALDH2) – Aldeído desidrogenase 2

(ROS) – Espécies reativas do oxigênio

(GTN) – Gliceril trinitrato

(GDT) – Gliceril dinitrato

(mM) – Milimolar

(mg L⁻¹) – Miligramas por litro

(Kg) – Quilograma

(ISMN) – Mononitrato de isossorbido

(ISDN) – Dinitrato de isossorbido

(PETN) – Pentaeritril tetrahidratado

(Fe²⁺) – Ferro ferroso

(Fe³⁺) – Ferro férrico

(mmHg) – Milímetros de mercúrio

(μmol) – Micromoles

(μs) – Microsegundos

(HP) – Hipertensão pulmonar

(I/R) – Reperfusão isquêmica

(ATP) – Adenosina trifosfato

(μM) – Micromolar

(AVC) – Acidente vascular cerebral

(EAM) – Enfarte agudo do miocárdio

(DAP) – Doença arterial periférica

(DCV) – Doenças cardiovasculares

(NaNO₂) – Nitrito de sódio

(Ec50) – Concentração necessária para observar metade do efeito farmacológico

1. Introdução

Diversas evidências indicam que a utilização dos compostos inorgânicos, nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), pelo ser humano, já remota um período de aproximadamente 5000 anos. A aplicação primordial destes compostos, foi na conservação de alimentos com um sal denominado salpêtre ou nitrato de potássio (Yamasaki, Watanabe, Fukuto & Cohen, 2014). Quanto à sua aplicação terapêutica, há registros de aproximadamente 1000 anos atrás, que demonstram que estes compostos já têm vindo a ser utilizados pelos monges budistas, na China, no tratamento de dores agudas no coração, e na recuperação da temperatura das mãos e dos pés (Kevil, Kolluru, Pattillo & Giordano, 2011; Lundberg, Weitzberg & Gladwin, 2008).

Até há bem pouco tempo, os nitritos inorgânicos eram conhecidos como produtos metabólicos estáveis do óxido nítrico (NO), putativamente associados a reações adversas como cianose e carcinogénese e por isso considerados perniciosos do ponto de vista clínico (Powelson et al., 2008).

Porém, a identificação do NO em sistemas fisiológicos, em 1980, representou um avanço crítico no entendimento das patologias cardiovasculares, bem como das suas causas e mecanismos de regulação, sendo que hoje em dia diversas patologias estão caracterizadas pela insuficiência de NO (Milkowski, Garg, Coughlin & Bryan, 2010). Este óxido de azoto é produzido endogenamente por uma família de enzimas denominadas sintases do óxido nítrico NOS, sendo uma molécula sinalizadora fundamental na regulação cardiovascular, devido às suas ações vasodilatadoras, vasoprotetoras e anti-ateroscleróticas (Förstermann & Sessa, 2012; Kapil, Weitzberg, Lundberg & Ahluwalia, 2014). Recentemente foi descoberto um mecanismo de formação de NO, alternativo e independente da via NOS. Esta via veio demonstrar que os nitritos podem, em situações fisiopatológicas ou de hipóxia, ser reciclados no sangue, tecidos e células do corpo humano, para formar NO necessário à célula (Kevil et al., 2011). Este facto veio mostrar que o nitrito afinal, não é só um sub-produto resultante do metabolismo do NO, mas sim um potencial agente terapêutico numa variedade de patologias, ao modular a biodisponibilidade de NO (Perlman et al., 2009). Além disso pode servir de

marcador clínico, cujo diagnóstico, poderá ser útil na identificação de estados patológicos caracterizados pela insuficiência de NO (Bryan & Grisham, 2007).

Os nitritos podem ser obtidos por fontes exógenas como a dieta alimentar incluindo a água, ou serem sintetizados por via endógena, pela oxidação do NO derivado da via clássica das NOS, como pela redução do nitrato pela redutase da xantina, ou por bactérias da flora commensal oral.

Assim hoje em dia, a via da redução do nitrito pode ser encarada, como uma via de reserva à biossíntese de NO, quando esta não está funcional, como é o caso de doença cardiovascular. A descoberta desta via veio potenciar a ação terapêutica do nitrito em várias situações patológicas. Especificamente doenças associadas a reduções dos níveis tecidulares de oxigénio (O_2), ou de pH, ou ainda que bloqueiem o fluxo sanguíneo, definem os principais alvos terapêuticos dos nitritos, principalmente em doenças cardiovasculares (Bueno, Wang, Mora & Gladwin, 2012; Lundberg et al., 2008).

2. Óxido nítrico

2.1- Biossíntese e metabolismo

2.1.1- Via clássica (NOS) - Sintase do óxido nítrico

O NO é uma molécula gasosa lipofílica instável de ação autocrina e parácrina com tempo de semivida bastante limitado, sendo metabolizada maioritariamente antes de chegar às células alvo (Lundberg et al., 2008). Tal facto contribuiu para o atraso dos investigadores na identificação desta molécula, a qual, quando descoberta por Furchgott e Zawadzki em (1980), foi denominada de fator relaxamento derivado do endotélio, de acordo com a sua ação farmacológica e local de síntese. Só mais tarde veio a ser identificada por Ignarro et al. em (1987); Palmer et al. em (1987), como NO (Dejam, Hunter, Schechter & Gladwin, 2004; Loscalzo, 2013; Sindler, Devan, Fleenor & Seals, 2014).

A biossíntese clássica de NO é assegurada por uma família de enzimas denominadas de sintases do óxido nítrico (NOS). Existem 3 isoformas denominadas de acordo com o local onde são expressas e sua função (**figura 1**), que incluem: a sintase do óxido nítrico neural (nNOS ou NOS1); a sintase do óxido nítrico induzida (iNOS ou NOS2); e a sintase óxido nítrico endotelial (eNOS ou NOS3) (Förstermann & Sessa, 2012; Kevil et al., 2011).

A L-arginina serve de substrato a todas as isoformas da NOS, sendo que estas utilizam como co-substratos o O_2 e a forma reduzida e fosfatada do dinucleótido nicotinamina-adenina (NADPH). Para facilitar as reações de oxidação e redução, que convertem a L-arginina em L-citrolina, com formação de NO, é necessário a existência de cofatores como a tetrahydro-L-biopterina (BH_4), o dinucleótido flavina-adenina (FAD) e mononucleótido flavina (FMN), que provocam alterações conformacionais na enzima, permitindo a regulação da síntese de NO em diferentes condições fisiológicas (Förstermann & Sessa, 2012; Kevil et al., 2011).

A estrutura básica da NOS, é composta por 2 monómeros, contendo cada um, um domínio redutase e um domínio oxigenase (**figura 2**). Para que seja funcional, é necessária a presença de calmodulina (caM) e grupos hemo. A caM facilita a transferência

de eletrões entre o domínio redutase e o domínio oxigenase (**figura 2A**), enquanto os grupos hemo, são essenciais na transferência de eletrões entre os dois monómeros e só na presença destes é que a enzima consegue converter a L-arginina em NO (**figura 2B**) (Förstermann & Sessa, 2012; Kevil et al., 2011).

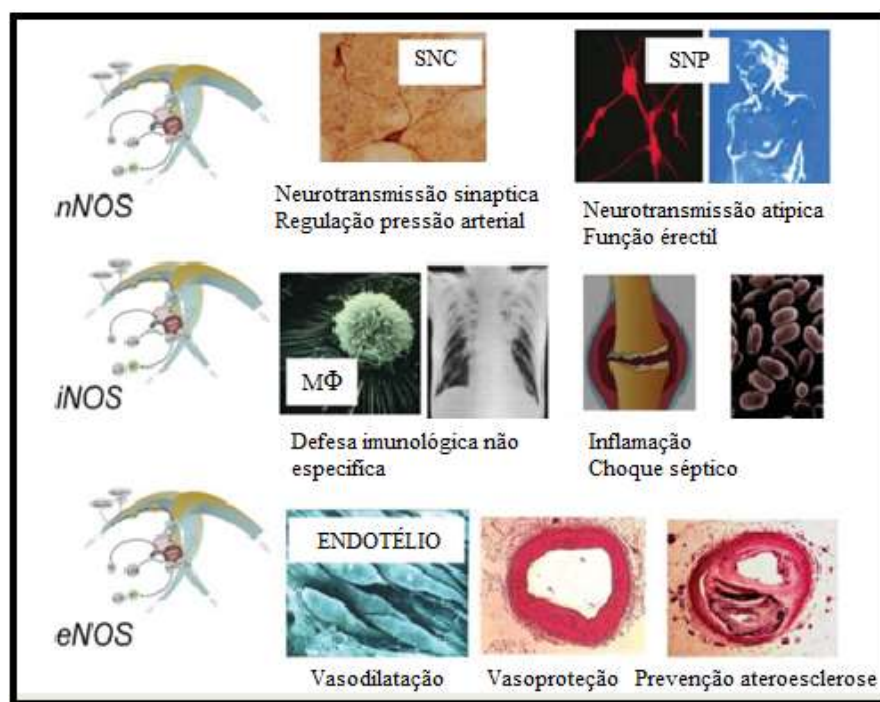


Figura 1 - Local da biossíntese e função fisiológica do óxido nítrico. Traduzido de: (Förstermann & Sessa, 2012)

Deste modo o complexo enzimático NOS, garante a síntese de NO através de dois passos. Primeiro decorre a hidroxilação da L-arginina em N^ω-hidroxi-L-arginina. No segundo passo, os grupos hemo utilizam os eletrões para reduzir o oxigénio molecular (O₂) e oxidar a N^ω-hidroxi-L-arginina, com formação de NO e L-citrolina (Förstermann & Sessa, 2012).

A quantidade de NO sintetizado bem como os requisitos necessários á sua bio-formação dependem da isoforma que lhe dá origem. Nas isoformas nNOS e eNOS, a ligação de caM está dependente dos níveis elevados de cálcio intracelular (200 a 400 nM), enquanto na isoforma iNOS a ligação de caM é conseguida com concentrações de cálcio mais baixas (inferiores a 40 nM). No que diz respeito à síntese de NO, a eNOS produz essencialmente quantidades reduzidas de forma constitutiva, enquanto a iNOS produz grandes quantidades em situações inflamatórias (Bryan, 2006; Förstermann & Sessa, 2012)

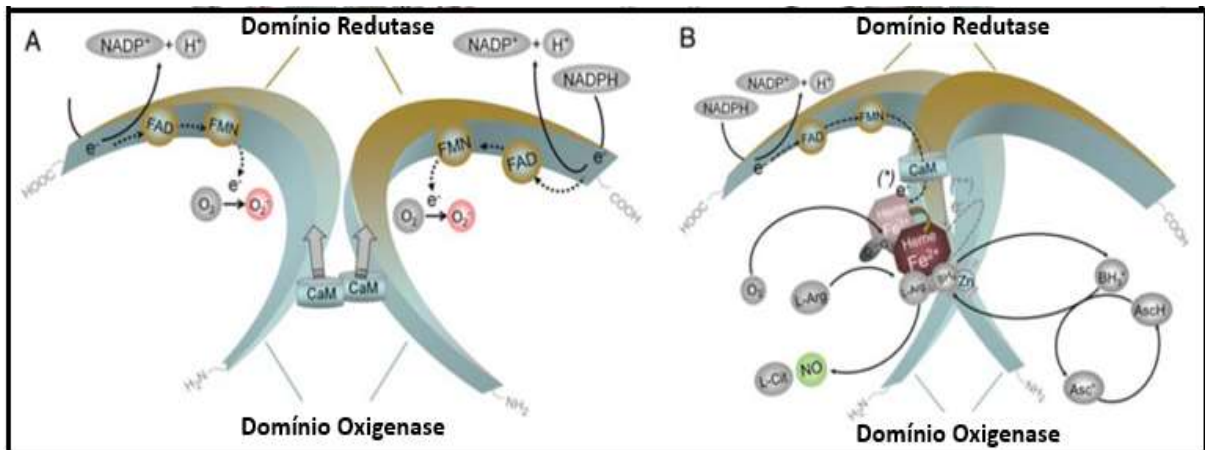


Figura 2 - Estrutura e regulação da sintase do óxido nítrico (NOS). Traduzido e adaptado de: (Förstermann & Sessa, 2012)

Óxido nítrico sintase neural (nNOS):

A nNOS é expressa de forma essencial nos neurónios específicos do cérebro. Para além disso, a nNOS, foi identificada em estudos imuno-histológicos químicos, no músculo-esquelético, músculo liso vascular, gânglios simpáticos e glândulas suprarrenais, na espinal medula, nos nervos periféricos nitrérgicos, em células epiteliais de vários órgãos inclusive células do rim e ilhéus pancreáticos (Förstermann & Sessa, 2012; Zhou & Zhu, 2009).

A NOS neural, é responsável pela modulação de funções fisiológicas como a neurogénese e plasticidade neural, influenciando a aprendizagem e criação de memórias, e por outro lado responsável pela patogénese de algumas doenças como Parkinson ou depressão, estando implicado em situações de neurotoxicidade e isquemia (Förstermann & Sessa, 2012; Zhou & Zhu, 2009).

Para além disso, existem provas de que a nNOS desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial a nível central via sistema nervoso central (SNC), pois estudos demonstram, que a inibição da nNOS na medula e no hipotálamo manifesta-se em aumentos da pressão arterial sistémica. Outros estudos indicam que a nNOS também é responsável pela regulação da pressão arterial a nível periférico. O NO sintetizado pela nNOS nos nervos nitrérgicos, estimula a guanil-ciclase solúvel (sGC) sensível ao NO, a qual aumenta os níveis de guanosina monofosfato (GMP) cíclico ou (cGMP), resultando

num relaxamento das células dos diferentes tipos de músculo liso, incluindo o vascular. (Förstermann & Sessa, 2012; Zhou & Zhu, 2009)

Estas observações evidenciam uma importante responsabilidade do NO na regulação da função erétil, bem como no tratamento da disfunção. Uma vez que o corpo cavernoso é regulado por nervos nitrérgicos, a sua função vasodilatadora e erétil é então dependente da atividade da nNOS e dos níveis cGMP. O mesmo se verifica no caso dos tratamentos para a disfunção como sildenafil, vardenafil e tadalafil, que para serem efetivos necessitam igualmente de uma atividade mínima da nNOS, pois só inibem as fosfodiesterases-5, que degradam o GMP cíclico responsável pela vasodilatação (Förstermann & Sessa, 2012).

Óxido nítrico sintase induzida (iNOS):

A sintase do NO induzida iNOS, não é expressa em células específicas, como no caso das outras isoformas. Esta pode ser expressa em qualquer célula ou tecido, desde que reúna os agentes indutores adequados, podendo ser induzida por citocinas, oligossacáridos bacterianos, entre outros. A iNOS foi identificada primeiramente nos macrófagos, e contrariamente às outras isoformas eNOS e nNOS quando expressa, está constantemente ativa e produz grandes quantidades de NO, independentemente das concentrações intracelulares de cálcio (Bogdan, 2015; Förstermann & Sessa, 2012).

O óxido nítrico sintetizado pela isoforma II iNOS, é um mediador tanto na resposta imunitária inapta, como na adquirida, sendo responsável por efeitos antimicrobianos, antiparasitários, antivirais e antitumorais. Isto é possível uma vez que o NO, bem como outras espécies reativas de nitrogénio (RNS), têm a capacidade de inibir a atividade de mecanismos essenciais à divisão, desenvolvimento ou metabolismo celular, ao interferir com processos como o ciclo do ácido cítrico, ou no transporte mitocondrial de eletrões, ou replicação do ADN (Bogdan, 2015).

Desta forma, o NO provoca fragmentação e ou inibição do crescimento celular, sendo assim responsável pelo efeito citotóxico e citostático nos microrganismos e algumas células tumorais. A expressão desta enzima é fundamental no controlo de bactérias intracelulares como por exemplo *Micobacterium tuberculosis* e parasitas como *Leishmânia* ou esporozoítos da malária (Bogdan, 2015).

O radical de NO sintetizado pela iNOS é lábil, reagindo portanto com varias espécies, com formação de múltiplos RNS que podem estar tanto na origem de alguns

efeitos regulatórios, como também de efeitos tóxicos. Estes grupos incluem S-nitrosotiol formado a partir da reação do NO, com grupos tiol das cisteínas dos péptidos e proteínas; e a peroxinitrite (ONOO-) que é um produto da reação do NO com o superóxido (O_2^-), capaz de modificar proteínas com alteração da sua função (Bogdan, 2015).

Assim, o NO derivado da iNOS não é apenas tóxico para os microrganismos patogénicos, mas pode também ser citotóxico para o ser humano, provocando *stress* oxidativo e danos tecidulares. A iNOS regula ainda vários tipos de sintomas e doenças inflamatórias e é mediadora de vários dos seus sintomas como vasodilatação e hipotensão (Bogdan, 2015; Förstermann & Sessa, 2012).

Em casos de exacerbação, estes sintomas podem levar ao choque séptico. A larga maioria de lesões inflamatórias e autoimunes estão associadas a locais de grande concentração de macrófagos e neutrófilos ativados, colocando em debate a responsabilidade da iNOS na rejeição de transplantes (Bogdan, 2015; Förstermann & Sessa, 2012).

Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS):

De carácter distinto das outras isoformas, a eNOS é proeminentemente expressa em todas as células endoteliais. O óxido nítrico NO derivado desta enzima desempenha um papel regulador homeostático de diversas funções fisiológicas cardiovasculares essenciais, como vasodilatação, proteção vascular, estimulação da angiogénese, e inibição dos seguintes processos fisiológicos: agregação plaquetar, adesão leucocitária, inflamação vascular e aterogénese (Qian & Fulton, 2013).

No que diz respeito á atividade da enzima e quantidade de NO sintetizado, ao contrário do que se pensava originalmente, a eNOS não sintetiza NO de forma constitutiva. É regulada através de modificações transcrpcionais, pós-transcrpcionais e principalmente pós-traducionais, sendo que a sua atividade é dependente de vários fatores como a biodisponibilidade de substratos e cofatores, grau de fosforilação da enzima, nível de acetililação, S-nitrosilação e interação de proteínas. Quando maior for o nível de cálcio intracelular maior será a atividade da enzima pois o cálcio estimula a ligação da enzima com a caM, permitindo a transferência de eletrões (Qian & Fulton, 2013).

Adicionalmente várias outras proteínas influenciam e regulam a atividade da eNOS, como por exemplo, a proteína de choque térmico 90 (HSP 90), a qual ativa alostericamente a enzima, ao promover o acoplamento enzimático (Förstermann & Sessa, 2012; Qian & Fulton, 2013).

Por outro lado, existem mecanismos que regulam a eNOS negativamente, ou seja diminuem a sua atividade, como é o caso da S-nitrosilação pelo próprio NO como mecanismo de retroalimentação, quando este está em excesso. Ou o caso da peroxinitrite (ONOO^-), que inativa a enzima ao promover o desacoplamento da eNOS. A atividade desta enzima pode também ficar comprometida em casos disfunção endotelial, riscos e ou doenças cardiovasculares (Förstermann & Sessa, 2012; Qian & Fulton, 2013).

De um modo geral, a sinalização do NO nos vasos sanguíneos, que regula importantes funções fisiológicas cardiovasculares, é conseguida através de dois mecanismos de ação. O primeiro mecanismo processa-se através da ativação da via de sinalização sGC-cGMP por ligação do NO à sGC. A afinidade deste último aos grupos hemo da sGC, resulta num aumento dos níveis de cGMP, que ativa kinases GMP-dependentes, com consequente diminuição dos níveis de cálcio intracelular. Desta forma, esta via medeia processos como o relaxamento de células vasculares do músculo liso, bem como inibição da agregação plaquetar (Förstermann & Sessa, 2012; Qian & Fulton, 2013).

O segundo mecanismo de ação consiste na S-nitrosilação de proteínas por parte do NO ou dos seus metabolitos, e baseia-se na capacidade destes em reagirem com os resíduos de cisteína de algumas proteínas alvo, provocando modificações covalentes reversíveis nestes resíduos, com consequente formação de S-nitrosotiol (Qian & Fulton, 2013). As enzimas que tornam possível a reversão da S-nitrosilação nas proteínas são, a redutase S-nitrosoglutathiona (GSNOR) e a tioredoxina 1 (Trx1), que por sua vez permitem ao NO atuar como sinalizador intracelular, e regular de forma reversível a atividade e a função de várias proteínas, influenciando desta maneira um variado número de processos biológicos como apoptose, secreção de proteínas, proliferação celular, atividade da NOS, canais iónicos, contractibilidade muscular e regulação do fluxo sanguíneo (Qian & Fulton, 2013).

2.1.2- Via nitrato-nitrito-óxido nítrico

Até há relativamente pouco tempo, o nitrato e nitrito inorgânicos eram classificados como produtos estáveis da oxidação do NO. Enquanto o primeiro é considerado inerte, o segundo é conhecido pela sua toxicidade, ao ser um agente causador de meta-hemoglobinemia (cianose ou *blue baby syndrome*) em recém-nascidos. Por outro lado pensava-se que o seu uso em conservas alimentares e carne curada, originava

espécies mutagénicas denominadas nitrosaminas (Greer & Shannon, 2005; Lundberg, Weitzberg & Gladwin, 2008; Sindler et al., 2014; Yamasaki, Watanabe, Fukuto, Cohen & Ascorbate, 2014). No entanto, testes em animais bem como estudos epidemiológicos prolongados, não indicaram correlação entre nitritos e a carcinogénese. Aliás nos últimos anos têm-se vindo a descobrir que estes aniões, podem afinal, em certas condições, ser reciclados no sangue e tecidos para formar NO através de múltiplas vias (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008; Yamasaki et al., 2014). Nos mamíferos, em condições fisiológicas normais (normóxia), o óxido nítrico sintetizado pela NOS, é rapidamente oxidado no sangue por hemoproteínas, como a oxihemoglobina dando origem a NO_3^- , ou a ser oxidado no sangue na presença de oxigénio ou ceruloplasmina em NO_2^- (**figura 3**). Em situações de hipoxia e ou isquemia, o NO que tem importantes funções reguladoras, não pode ser produzido pela via clássica NOS, uma vez que esta é dependente de O_2 , no entanto a sua síntese é assegurada pela redução dos nitratos e nitritos de forma independente de O_2 , como será abordado adiante neste subcapítulo e no capítulo 3. (Bogdan, 2015; Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008).

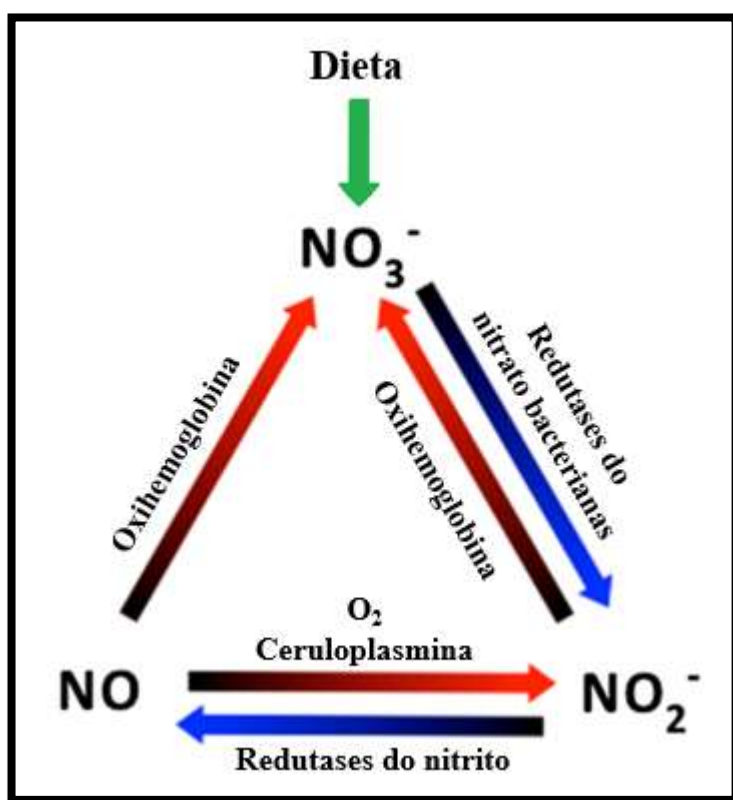


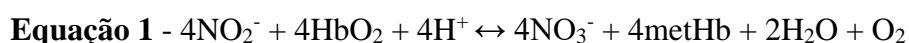
Figura 3 - Via nitrato-nitrito-óxido nítrico. Traduzido e adaptado de: (Kapil et al., 2014)

Assim num processo de compensação, a via nitrato-nitrito-óxido nítrico, é gradualmente ativada, à medida que os níveis de oxigénio baixam. Deste ponto de vista, esta via pode ser encarada como um sistema complementar à via clássica, assegurando a produção de NO, mesmo quando o fornecimento de O₂ fica comprometido (Bryan, 2015; Hord, Tang & Bryan, 2009).

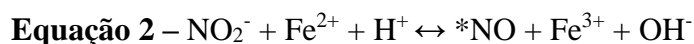
Em condições fisiopatológicas ou de *stress* fisiológico, são vários os processos alternativos capazes de reduzir o nitrito e assegurar a formação de NO no sangue e tecidos, nomeadamente a redução acídica, redução por globinas proteicas contendo grupos hemo, ou ainda por redução enzimática (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008).

Redução do nitrito (NO₂⁻) por proteínas hémicas

Tanto o óxido nítrico NO como o nitrito NO₂⁻ são moléculas oxidadas rapidamente no sangue, dando origem a nitratos NO₃⁻. Em condições fisiológicas de normóxia a hemoglobina oxigenada ou oxihemoglobina (oxiHb), tem uma grande afinidade para reagir com o NO e NO₂⁻, com consequente formação de NO₃⁻ e metahemoglobina (metHb) (**equação 1**) (**fig. 2**) (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008; Curtis, Hsu, Noguchi, Geary & Shiva, 2012; Jensen, 2009).



Porém, a hemoglobina pode, dependentemente da tensão parcial de oxigénio P (O₂) e do seu estado de conformação R-T, reduzir o NO₂⁻ em NO. A desoxihemoglobina (desoxiHb), forma preferencial assumida a baixas P (O₂), tem a capacidade de reduzir o NO₂⁻ em óxido nítrico (**equação 2**), e provocar assim vasodilatação (**figura 4**) (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008; Curtis, Hsu, Noguchi, Geary & Shiva, 2012; Jensen, 2009).



No entanto, existem outras globinas que também participam na redução do nitrito, como é o caso da mioglobina, neuroglobina e citoglobina. Estas últimas da mesma forma que a hemoglobina, nas suas formas desoxigenadas, podem também atuar como redutases do nitrito, sendo que a desoximioglobina (desoxiMb), em particular, pode reduzir o nitrito a uma velocidade 30 vezes superior à (desoxiHb) (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008; Curtis, Hsu, Noguchi, Geary & Shiva, 2012; Jensen, 2009). Quando a mioglobina,

no sub-endocárdio do coração, fica no seu estado desoxigenado, condição observada em situações de esforço ou exercício do músculo-esquelético, tem a capacidade de reduzir rapidamente o nitrito. Como explicado e desenvolvido mais á frente no, o NO sintetizado desta forma consegue ligar-se à oxidase do citocromo C da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, reduzindo o consumo de oxigénio. Ensaios em modelos animais, onde foi silenciada a expressão de mioglobina, resultaram na ausência da síntese de NO, bem como na observação de maiores consumos cardíacos, evidenciando o importante papel da mioglobina e do nitrito na regulação energética cardíaca, bem como dos consumos de O₂ em situações de hipoxia (Kevil et al., 2011; Curtis, Hsu, Noguchi, Geary & Shiva, 2012; Jensen, 2009).

Estes resultados vieram clarificar a existência de vias alternativas que conferem ao nitrito a capacidade de ser reciclado biologicamente em NO, tornando evidente o papel do primeiro como reservatório e precursor do segundo. Deste modo, a produção e a biodistribuição do anião NO₂⁻ no corpo humano, pode ser encarado como um mecanismo fisiológico para o NO atuar de forma endócrina, explicando como uma molécula tão instável e com curto tempo de semivida como o NO pode atuar em tanta variedade de proteínas e assim regular variadíssimos processos fisiológicos (Curtis et al., 2012).

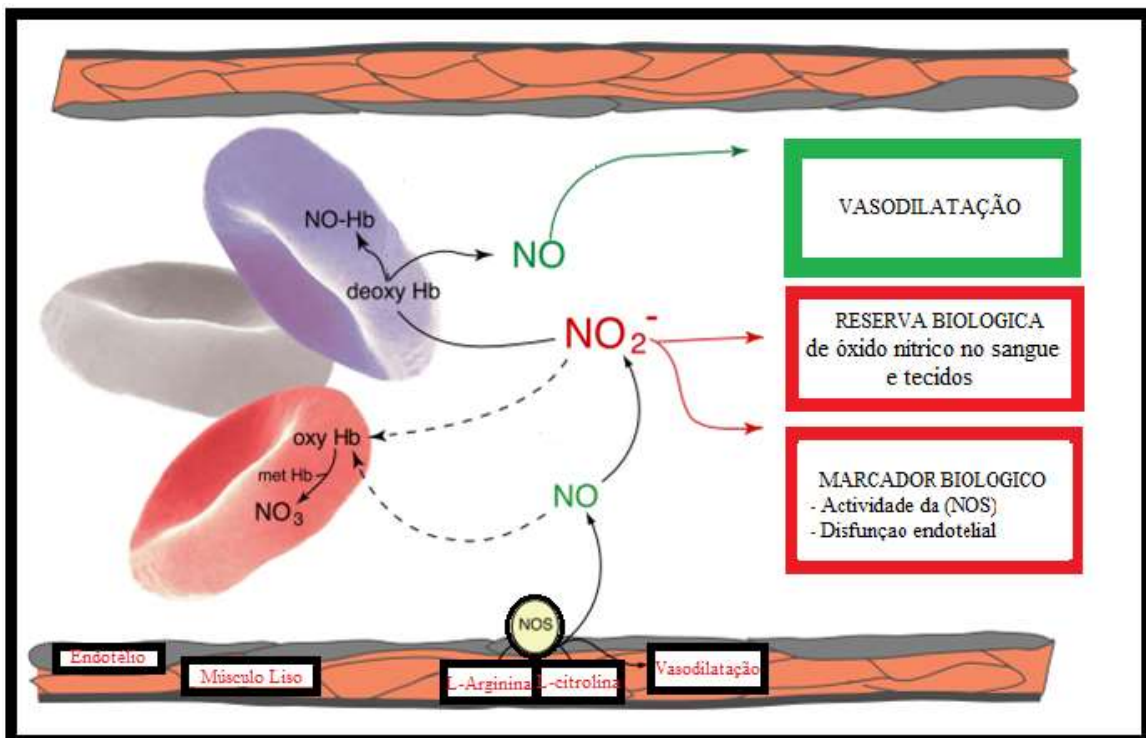
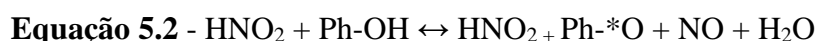
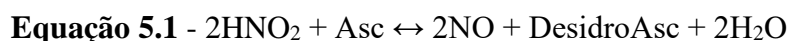
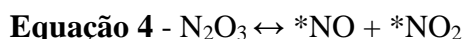
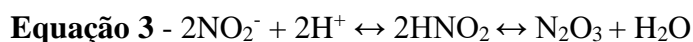


Figura 4 - Função e metabolização do nitrito e óxido nítrico pela hemoglobina em diferentes tensões de oxigénio adaptado e traduzido de: (Dejam et al., 2004)

Redução acídica do nitrito (NO_2^-)

Na ausência de oxihemoglobina, e a um pH fisiológico de 7.0-7.4 o anião NO_2^- é estável, o que já não se verifica em condições acídicas (pH de 3.2- 3.4) onde o nitrito é convertido primeiramente em ácido nitroso (HNO_2), uma molécula instável que dá origem ao trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), que por sua vez forma NO. Existem evidências que a desprotonação acídica do nitrito ocorre em várias situações biológicas, em todo o corpo humano, e constitui um importante mecanismo de redução do nitrito em vários compartimentos tecidulares (Kevil et al., 2011; Yamasaki et al., 2014).

No estômago, por exemplo, é possível reduzir acídicamente os nitritos provenientes da saliva. Estes, formam (HNO_2) que dá origem a (N_2O_3) (**equação 3**), que por sua vez se decompõe em NO (**equação 4**). Esta reação pode ser potenciada com a presença de ácido ascórbico (vitamina c) (**equação 5 e 5.1**) e polifenóis (**equação 5 e 5.2**) (Bryan, 2015). A presença destes compostos no estômago, confere propriedades bactericidas ao fluido gástrico e promove a secreção de muco ao estimular o fluxo sanguíneo gastrointestinal, através da ação vasodilatadora. Estas características defendem o estômago de invasões contra microrganismos patogénicos bem como ajuda a prevenir e a curar úlceras gástricas (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008; Yamasaki et al., 2014).



Na urina também se verifica a redução do nitrito a óxido nítrico, quando a mesma se encontra moderadamente ácida (pH 5-6). A formação de NO tem a função de atuar como agente bactericida, de forma semelhante ao estômago, protegendo assim da colonização de microrganismos. Este efeito é significativamente potenciado na presença do ácido ascórbico (vitamina c). Alguns resultados, mostram que *in vitro* a potência bactericida do nitrito e ácido ascórbico podem ser comparadas à potência de antibióticos tradicionais, como nitrofurantoina e trimetopim. Note-se que na medicina tradicional, a ingestão de vitamina c está indicada no tratamento de infeções urinárias (Lundberg et al., 2008).

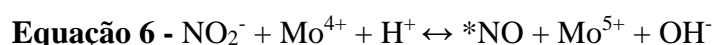
Estudos recentes em modelos animais, também revelaram que em casos de isquémia e de alterações moderadas do pH fisiológico, os níveis fisiológicos de nitrito provocaram

vasodilatação da aorta dos ratos. Uma vez que a inibição da sGC provocou a inibição desse efeito, foi possível mostrar que o NO é responsável pela vasodilatação da aorta. Esta observação revelou que alterações moderadas do pH são suficientes para induzir a redução do NO_2^- em NO, demonstrando que esta via pode modular de forma significativa a biodisponibilidade de NO, durante situações hipoxia e isquemia onde a NOS se encontra inativa (Kevil et al., 2011).

Redução enzimática do nitrito (NO_2^-)

Várias enzimas incluindo a oxiredutase da xantina (XOR); enzimas mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons, mais especificamente a oxidase do citocromo C, podem utilizar o nitrito alternativamente ao (O_2) como aceitador de elétrons e assim formar NO em situações de hipóxia. Estudos mais recentes demonstram a existência de mais enzimas e vias mediadoras da redução do nitrito, incluindo a desidrogenase 2 do aldeído (ALDH2) e a própria eNOS (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008).

A XOR é particularmente conhecida por reduzir o (O_2) em superóxido, mas pode em condições anaeróbicas e baixos valores de pH, reduzir o nitrito para formar NO através do seu grupo químico molibdénio (**equação 6**) (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008).



A XOR utiliza o NADPH como substrato redutor, que atua por sua vez como doador de elétrons à enzima, catalisando assim a redução do nitrito. De forma controversa, alguns estudos evidenciam que a xantina e a hipoxantina são inibidoras desta reação, enquanto outros indicam que podem atuar da mesma forma que o NADPH, estimulando a redução do nitrito (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008).

A oxidase do citocromo C (complexo IV) é um complexo proteico transmembranar mitocondrial, importante na respiração celular, que faz parte integrante da cadeia transportadora de elétrons ao atuar como recetor final de elétrons. Em normóxia, o NO sintetizado pela NOS inibe diretamente o complexo IV, com consequente formação de espécies oxidativas reativas ROS, potencialmente lesivas para a célula. No entanto em hipoxia, o mesmo complexo pode reduzir o nitrito em NO, assim como o nitrito pode

inibir diretamente o complexo (I) gerando a formação de ROS (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008).

Adicionalmente a eNOS em condições de anóxia, também pode ser responsável pela redução do nitrito em NO. Nestas circunstâncias, não há O₂ suficiente para a conversão da L-arginina em NO, e desta forma a via fica bloqueada. No entanto, no domínio oxigenase da proteína, o nitrito pode ser utilizado como substrato substituto da L-arginina e convertido em NO, sem recurso à utilização do cofator BH₄, evidenciando assim que a via da redução anóxica do nitrito pode sustentar os níveis basais de NO, observando-se um aumento da sua produção em 6 vezes (Gautier, van Faassen, Mikula, Martasek & Slama-Schwok, 2006)

Devido à intervenção ALDH2, na catálise do nitrato orgânico gliceril trinitrato (GTN) em gliceril dinitrato (GDT) e nitrito, investigadores hipotizaram se esta teria um papel na redução do nitrito. Desta modo, testou-se a intervenção desta enzima em modelos animais, ao administrar em ratos nitrito de sódio com e sem inibidores da enzima. Assim, observou-se uma diminuição da redução da pressão arterial após a administração de nitrito de sódio com inibidores enzimáticos, comparativamente à administração de NO₂⁻ sem inibidores, comprovando que a ALDH2 tem um papel ativo na redução do nitrito em modelos animais (Sonoda et al., 2014)

2.2 – Biorelação entre óxido nítrico (NO) e nitrito (NO₂⁻)

O óxido nítrico é uma molécula responsável pela regulação de várias funções fisiológicas, uma vez que pode atuar como sinalizador intracelular e modulador da função de várias proteínas. Diversos processos fisiológicos estão dependentes desta molécula para o seu funcionamento. Desta forma, o NO é fulcral ao bem-estar e saúde humana, sendo que manter os níveis homeostáticos de NO é essencial para manutenção de variados processos fisiológicos, nomeadamente cardiovasculares (Bryan, 2006; Dejam et al., 2004; Sindler et al., 2014). Esta molécula tem um curto tempo de semivida ($t_{1/2}$) na ordem dos microssegundos (**Tabela 1**), sendo rapidamente oxidada no sangue para nitritos e nitratos. Já estes aniões, têm ($t_{1/2}$) significativamente mais longos na ordem dos minutos ou horas, pois são rapidamente captados da circulação para os tecidos periféricos, prorrogando a sua metabolização. Assim em caso de necessidade podem ser, novamente reduzidos no sangue e tecidos em NO, por ação de várias redutases endógenas. Esta via de redução do

NO₂⁻ pode em certos tecidos originar uma quantidade de NO 10.000 vezes maior, comparativamente à quantidade sintetizada pela via constitutiva NOS (Bryan, 2006; Dejam et al., 2004; Sindler et al., 2014).

Tabela 1 - Tempos de semivida dos nitratos, nitritos e óxido nítrico no plasma. Traduzido e adaptado de: (Hord et al., 2009)

Espécies	Tempo de Semivida ($t_{1/2}$)
Nitrato	5-8 horas
Nitrito	1-5 minutos
Óxido Nítrico	1-2 microssegundos

No entanto, apesar da maioria das funções fisiológicas do NO_2^- serem conseguidas maioritariamente por via da ação do NO, há evidências que este anião também desempenha funções pela sua ação direta, nomeadamente na citoproteção, através da sua ação na mitocôndria em condições de hipoxia, prevenindo a formação de (ROS). (Lundberg et al., 2009; Omar et al., 2015).

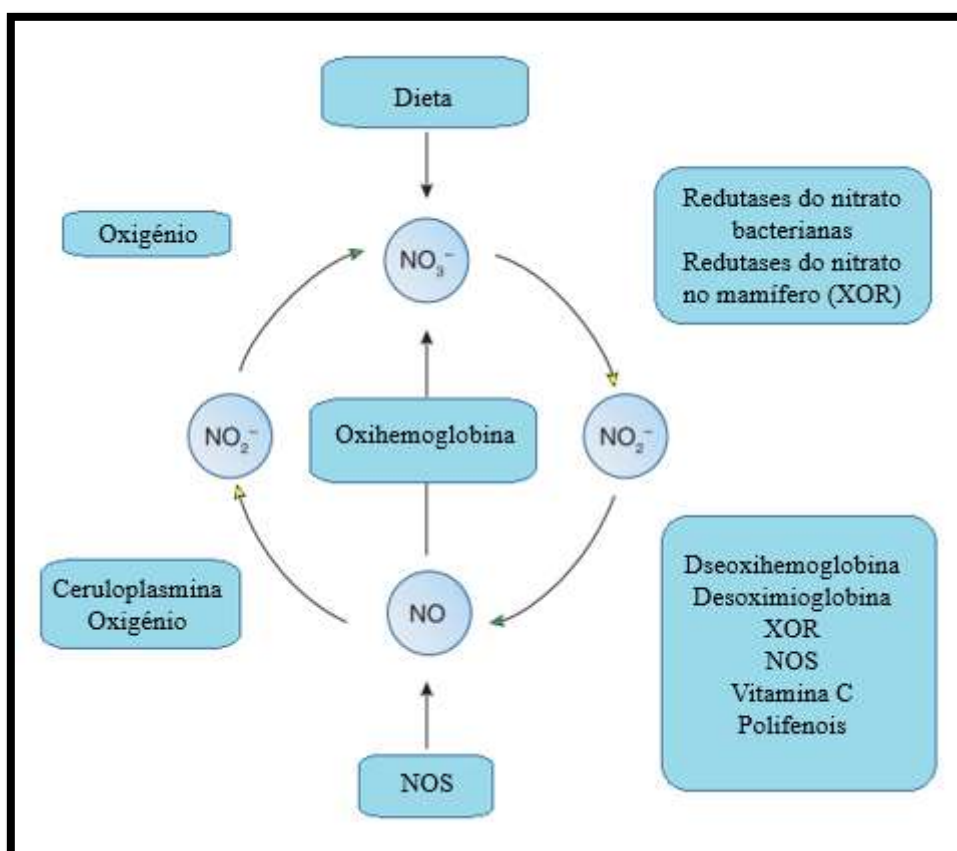


Figura 5 - Ciclo do nitrato, nitrito e óxido nítrico no mamífero. Traduzido e adaptado de: (Lundberg et al., 2009)

Em suma, todas estas vias desempenham um papel fulcral como vias de apoio alternativas à via clássica, compensando e assegurando a síntese de NO, em situações fisiopatológicas, mantendo assim os seus níveis homeostáticos. Assim, o aumento da compreensão do papel fisiológico destes aniões, bem como das suas vias metabólicas e ações fisiológicas, vieram renovar a sua antiga imagem, de um produto do metabolismo do NO e agente causador de mutagénese e cianose, para um precursor de NO num vasto número de funções fisiológicas, modulando assim a sua biodisponibilidade e bioatividade em casos fisiopatológicos ou de disfunção da NOS. No global todos estes compostos, os nitratos, nitritos e o óxido nítrico estão biorelacionados e compõem o ciclo do óxido nítrico no corpo humano, como ilustrado em cima (**figura 5**) (Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008).

3. Nitritos inorgânicos

Os nitritos inorgânicos fisiologicamente disponíveis no nosso organismo, podem ser fornecidos por via exógena, bem como ser biossintetizados por via endógena. A dieta e outras fontes ambientais constituem as fontes exógenas, enquanto que as vias endógenas englobam a auto oxidação do NO sintetizado pela NOS, bem como a redução do nitrato pela XOR ou por bactérias comensais presentes na cavidade oral e no trato gastrointestinal (Jansson et al., 2008; Yamasaki et al., 2014).

3.1-Fontes exógenas

Dieta e outras fontes ambientais:

Os nitratos e os nitritos podem ser obtidos por via exógena por diversas vias, porém a dieta é a sua maior fonte, sendo que a ingestão de alimentos ricos nestes compostos, traduz-se num significativo aumento dos seus níveis séricos. Após uma refeição rica em nitratos, tanto os níveis plasmáticos destes como os de nitritos sobem significativamente, e mantêm-se elevados durante um período prolongado, visto que o tempo de semivida plasmática do nitrato é de aproximadamente 5 a 6 horas e do nitrito 1 a 5 min (**Tabela 1**). Adicionalmente, ainda é observável elevação das concentrações ao nível salivar de nitratos e nitritos para (10 mM) e de (1-2 mM) respetivamente (Hord et al., 2009; Lundberg, Carlström, Larsen & Weitzberg, 2011; Machha & Schechter, 2011; Yamasaki et al., 2014). Assim, os nitratos provenientes da dieta são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal superior, entrando na corrente sanguínea onde se encontram com outros NO_3^- , provenientes da oxidação do NO endógeno, sintetizado por seu turno, pelo complexo enzimático NOS. Embora a maior parte deste nitrato seja excretado na urina, cerca de 25% é levado através da circulação enterosalivar para as glândulas salivares, como ilustrado mais adiante na (figura 7 no subcapítulo 3.1.1) (Hord et al., 2009; Lundberg et al., 2011; Machha & Schechter, 2011; Yamasaki et al., 2014)

Os grupos alimentares com maior teor em nitratos e nitritos são as carnes curadas, os hortícolas e os frutícolas, no entanto a sua distribuição não é equilibrada, visto que existem alimentos ricos em nitratos e pobres em nitritos ou vice-versa. Apesar dos nitritos serem diretamente obtidos na alimentação por via de carnes curadas ou produtos processados industrialmente, a maior parte de NO_2^- biodisponível é fornecida pela

ingestão de nitratos NO_3^- , encontrados em grande número nos hortícolas (**Tabela 2**) (Hord et al., 2009; Lundberg et al., 2011; Machha & Schechter, 2011; Yamasaki et al., 2014). Da totalidade de nitratos ingeridos pela dieta, mais de 80% são provenientes dos alimentos vegetais, sendo que as concentrações destes podem variar vastamente conforme a espécie do vegetal, bem como entre os próprios tecidos deste último (**Tabela 3**). Estas variações de concentrações podem ser justificadas devido a diferentes modos de fertilização com nitratos, ao longo do cultivo. (Hord et al., 2009; Lundberg et al., 2011; Machha & Schechter, 2011; Yamasaki et al., 2014).

Tabela 2- Teores de nitritos e nitratos nos frutícolas, hortícolas e carnes curadas. Traduzido e adaptado de (Hord et al., 2009)

<i>Tipo de Alimentos</i>	<i>Teor em Nitritos (mg/100g)</i>	<i>Teor em Nitratos (mg/100g)</i>
Frutícolas		
<i>Banana</i>	0.009	4.5
<i>Salada de frutas</i>	0.08	0.9
<i>Laranja</i>	0.02	0.8
<i>Molho maçã</i>	0.008	0.3
Hortícolas		
<i>Espinafres</i>	0.02	741
<i>Brócolos</i>	0.07	39.5
<i>Tomate</i>	0.03	39.2
<i>Sopa de legumes</i>	0.001	20.9
Carnes processadas		
<i>Cachorro Quente</i>	0.05	9.0
<i>Bacon</i>	0.38	5.5
<i>Fiambre</i>	0.89	0.9
<i>Lombo de porco</i>	0	3.3

Adicionalmente, estes aniões também podem ser ingeridos como consequência da utilização dos nitratos e nitritos pelo ser humano como fertilizantes, aditivos e ou conservantes alimentares, que são consequentemente ingeridos nos alimentos ou água contaminada. O processo de cura e conservação de carnes curadas é conseguido através da utilização um sal de nitrato de potássio, um conservante (E252) denominado saltpetre. Existindo registos de há mais de 5,000 anos, da sua aplicação como conservante. No

entanto só a partir do séc. XIX é que se começou a utilizar diretamente os nitritos em vez de nitratos como conservante em alimentos como, bacon, presunto, fiambre e outras carnes curadas (Yamasaki et al., 2014).

Tabela 3- categorização dos vegetais de acordo com os teores de nitratos. Traduzido e adaptado de: (Hord et al., 2009)

Teor em Nitratos (mg/100g peso fresco)	Variedade de vegetais
Muito Baixo < 20	Alcachofra, aspargos, fava, beringela, alho, cebola, feijão-verde, cogumelos, ervilha, pimenta, batata, abobrinha, batata-doce, tomate e melancia
Baixo < 50	Brócolos, cenoura, couve-flor, pepino e abóbora
Médio < 100	Repolho, nabo e couve lombarda
Alto < 250	Aipo-rábano, couve chinesa, endívia, erva-doce, couve-rábano e alho-porro
Muito Alto > 250	Aipo, agrião, cerefólio, alface, beterraba vermelha, espinafre e rúcula

Por outro lado, o consumo de água pode constituir igualmente uma fonte significativa destes aniões, principalmente em áreas rurais e agrícolas, onde as fontes aquíferas podem conter maiores níveis de contaminação por nitratos e nitritos, derivados da utilização de fertilizantes agrícolas. Adicionalmente o óxido nítrico proveniente da poluição atmosférica, provocada pela combustão industrial e veículos automóveis, potencia a contaminação das reservas aquíferas (**figura 6**) (Hord et al., 2009; Lundberg et al., 2011; Machha & Schechter, 2011; Yamasaki et al., 2014).

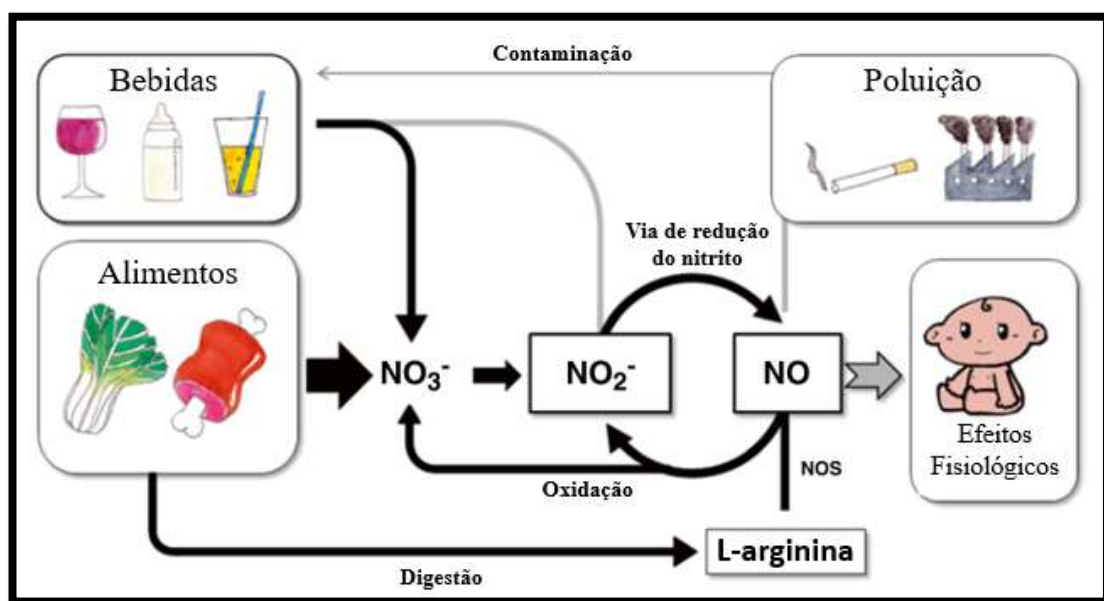


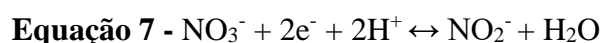
Figura 6 - Ciclo do nitrato, nitrito e óxido nítrico no mamífero. Traduzido e adaptado de: (Lundberg et al., 2009)

Sabendo que o leite representa a dieta principal dos mamíferos recém-nascidos, faz sentido avaliar a possível passagem destes compostos no leite materno (Yamasaki et al., 2014). Nos primeiros dias de amamentação, a quantidade de nitritos presentes no leite pode variar entre 0.8 e 2.1 mg L⁻¹, enquanto que ao longo deste período, as fêmeas secretam quantidades de NO₃⁻ de 1.4 até 11.2 mg L⁻¹. No entanto as concentrações destes aniões são substancialmente mais elevados no leite do que as concentrações observadas no plasma (Yamasaki et al., 2014). Contrariamente à ideia inicial que associava um grau de toxicidade ao nitrato e nitrito, estes resultados vieram informar que estes aniões possam afinal, ser benéficos e de certo modo essenciais, á saúde e fisiologia humana caso contrário estes compostos não seriam naturalmente introduzido no leite materno. Em reforço, os mamíferos também secretam durante a lactação níveis substanciais de fitoquímicos, inclusive flavonoides, que por sua vez, aumentão a conversão do nitrito em NO (Yamasaki et al., 2014).

3.2 - Fontes endógenas

3.1.1- Redução do nitrato salivar por bactérias comensais

Na cavidade oral existem bactérias anaeróbias facultativas capazes de reduzir o nitrato a nitrito, através da enzima redutase do nitrato. Como fonte energética alternativa, na ausência de (O₂) estas bactérias conseguem utilizar os nitratos como aceitadores finais de eletrões para ganhar adenosina trifosfato (ATP) (Lundberg et al., 2011). Assim, numa relação de simbiose entre bactéria e hospedeiro, os nitratos obtidos na dieta ou oriundos da circulação enterosalivar, são reduzidos pela flora comensal da cavidade oral em nitritos (**Equação 7**). Estes últimos quando em contacto com o ambiente ácido do estomago dão origem a ácido nítrico (HNO₂) e, consequente, ao trióxido de dinitrogénio (N₂O₃), que por sua vez se decompõe em NO (**figura 7**). (Kevil et al., 2011; Yamasaki et al., 2014).



O óxido nítrico formado no estômago, tem propriedades bactericidas e vasodilatadoras, que se manifesta numa melhor proteção gástrica contra o ácido, através do aumento da secreção de muco, bem como numa defesa contra microrganismos

patogênicos. Apesar de alguns microrganismos, conseguem prosperar no ambiente ácido do estômago, dificilmente conseguem sobreviver, perante a junção de nitritos com ácidos gástricos, uma mistura que constitui um eficiente agente bactericida (Lundberg et al., 2008; Yamasaki et al., 2014)

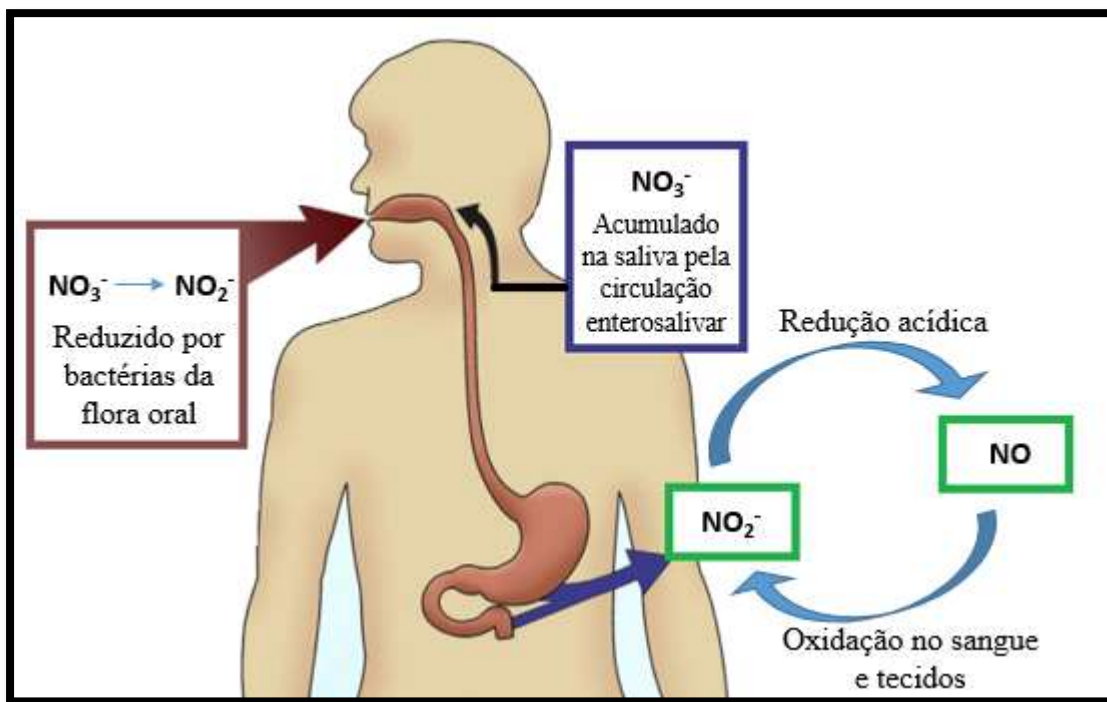
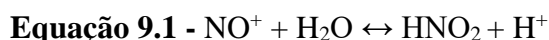
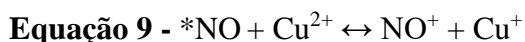
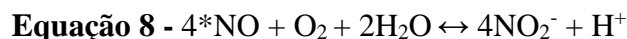


Figura 7 - Redução do nitrato salivar por bactérias da flora oral. Adaptado e traduzido de: (Kevil et al., 2011)

Assim apesar do nitrito ingerido poder ter origem direta da dieta, a maior parte é obtido após reciclagem do nitrato do plasma para a saliva, através da circulação enterosalivar, com posterior redução em nitrito pela flora comensal bacteriana e repetição da ingestão. Deste modo, relativamente à quantidade nitritos totais ingeridos, 93% são obtidos por esta via enterosalivar, enquanto apenas 7% são obtidos por via alimentar (Kevil et al., 2011; Yamasaki et al., 2014). Estes dados estão em concordância com outro estudo que demonstra que o ato compulsivo de cuspir saliva reduz a recirculação de nitrato para nitrito, após consumo de uma suplementação de nitratos. Estudos efetuados em ratos e porcos evidenciam que a reação de conversão do nitrato salivar ocorre numa área da parte posterior da língua, onde se observa maior colonização bactérias capazes de reduzir os nitratos em nitritos. Sendo que a relevância e influência desta via nos níveis séricos de nitritos é significativa ao ponto de se observar uma redução dos níveis séricos destes com o uso de antibióticos ou colutórios antissépticos de higiene oral (Kevil et al., 2011; Yamasaki et al., 2014).

3.1.2- Oxidação do óxido nítrico (NO) endógeno

Apesar da produção endógena de nitrito já ter sido identificada há mais de um século, o agente responsável pela mesma, bem como os respetivos mecanismos de regulação permaneceram desconhecidos até finais do sec. XX. Atualmente diversos estudos indicam, de forma consensual, que o nitrito de origem endógena é formado através da oxidação do NO, também ele sintetizado endogenamente através do complexo enzimático NOS (Yamasaki et al., 2014). O óxido nítrico assim formado, é oxidado no sangue e nos tecidos na presença de oxigénio, com formação de nitrito (**equação 8**). Apesar desta reação ser muito demorada, pode ser catalisada no plasma pela enzima ceruloplasmina (**equação 9, 9.1 e 9.2**), que facilita e acelera a conversão de NO em NO_2^- (Lundberg et al., 2008; Yamasaki et al., 2014).



3.1.3- Redução do nitrato pela xantina oxiredutase (XOR)

Apesar de, durante muito tempo, se pensar que células eucarióticas eram incapazes de reduzir o nitrato em nitrito, pois careciam da enzima redutase do nitrato. Resultados obtidos por Jasson et al. (2008), efetuados em roedores e tecidos humanos, demonstraram que afinal os mamíferos também são capazes, embora de forma pouco significativa, reduzir o nitrato em NO_2^- e NO através de enzimas endógenas redutoras do nitrato (Jansson et al., 2008; Lundberg et al., 2011).

O facto da utilização de alopurinol, inibidor da enzima XOR, provocar uma diminuição dos níveis de nitritos em ratos deficientes da enzima NOS, bem como privados de flora comensal, veio mostrar que a oxiredutase da xantina, para além da flora

comensal e da oxidação do NO derivado da NOS, constitui uma fonte de nitrito, capaz de elevar os seus níveis através da redução do nitrato (Jansson et al., 2008)

3.3- Nitratos e nitritos inorgânicos vs. Nitratos orgânicos

Quando se fala genericamente em nitratos e nitritos, é importante não confundir os nitratos e nitritos inorgânicos com os nitratos e nitritos orgânicos, pois enquanto os primeiros são simples iões formados endogenamente ou obtidos através da dieta, os nitratos orgânicos são mais complexos. Na sua maioria, são sintetizados a nível laboratorial, e podem variar no número de nitratos que os compõem, podendo ser mono, di, tri, ou tetranitratos. Alguns dos mais utilizados no tratamento de patologias cardiovasculares são, por ordem crescente de potência, o mononitrato de isossorbido (ISMN), o dinitrato de isossorbido (ISDN) o gliceril trinitrato (GTN), e ainda o pentaeritritil tetranitrato (PETN) (Omar, Artime & Webb, 2012).

Apesar de os compostos de ambas as origens, desempenharem a maior parte das suas funções por via da ação do óxido nítrico, existem bastantes diferenças entre as suas características moleculares e vias metabólicas, que se fazem refletir em perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos distintos. Tal facto traduz-se em níveis diferentes de biodisponibilidade obtidos, que por sua vez se manifestam em diferentes vias de administração, bem como possíveis formas farmacêuticas distintas. (Omar et al., 2012).

Administração:

Ao contrário dos compostos orgânicos, os nitratos e nitritos inorgânicos são sais hidrófilos, cuja absorção se realiza no trato gastrointestinal superior, e por isso conseguem evitar o efeito de primeira passagem hepática. Podem desta forma, ser administrados por via oral, pois conseguem obter uma maior biodisponibilidade relativamente aos nitratos orgânicos (Omar et al., 2012). No entanto apesar de a maioria dos nitratos orgânicos serem administrados por via bucal, sublingual ou transdérmica, o (ISMN) e o (ISDN), em particular, apresentam níveis mais reduzidos de metabolização hepática, o que lhes permite de igual forma ser administrados por via oral. Para além destas, vias tanto os nitratos orgânicos como os inorgânicos podem ser administrados por via inalatória (Omar et al., 2012).

Farmacodinâmica:

Ao comparar os perfis farmacodinâmicos, verifica-se que os nitratos orgânicos são vasodilatadores agudos muito mais potentes do que os nitritos inorgânicos, na medida que estes apresentam efeitos mais subtis e estão dependentes de certas condições fisiológicas. Por outro lado, o uso crônico de nitratos orgânicos está limitado pelo desenvolvimento de tolerância, caracterizado pelo desenvolvimento de disfunção endotelial, e agravamento de lesões isquêmicas preexistentes, enquanto o uso de nitritos inorgânicos, para além de conferir efeitos citoprotetores, ajuda na reperusão após isquemia, não provoca tolerância, e pode ainda compensar a função endotelial diminuída (Omar et al., 2012).

Farmacoterapia:

Os nitratos orgânicos estão indicados no tratamento sintomático da angina de peito bem como do enfarte do miocárdio, e são utilizados com este fim desde o início do século XIX. Apesar dos seus efeitos adversos, este grupo farmacológico tem vindo a dominar o mercado na terapêutica de doenças coronárias agudas, devido á sua rápida distribuição e pico de ação, associado à escassez de alternativas terapêuticas eficientes (Omar et al., 2012). Já os nitritos inorgânicos, num espaço de duas décadas, passaram de produtos potencialmente carcinogénicos resultante do metabolismo do óxido nítrico, para precursores e reguladores da biodisponibilidade de NO, o qual, é um potente vasodilatador, como já foi anteriormente referido. A partir do momento em que foram descobertas várias vias de redução do nitrito em NO, que permitem a sua reciclagem *in vivo*, estes compostos têm vindo a ganhar grande protagonismo do ponto vista científico. Desde então variados efeitos benéficos destes compostos tem sido descritos, evidenciando o enorme potencial terapêutico do nitrito em variadas condições fisiopatologias, principalmente em doenças cardiovasculares (Bailey, Feelisch, Horowitz, Frenneaux & Madhani, 2014; Omar et al., 2012)

3.4- Nitrito - marcador biológico e método de diagnóstico de fisiopatologias

Dado que o distúrbio da biodisponibilidade de NO, assim como o distúrbio da biorelação entre nitrito e óxido nítrico, podem contribuir para o desenvolvimento estados fisiopatológicos distintos, principalmente ao nível cardiovascular, desde disfunção celular endotelial, desenvolvimento de aterosclerose, doença vascular periférica, bem como em casos mais graves lesões isquémicas (Bryan, 2006; Kevil et al., 2011). Para

além de sintomas cardiovasculares, os mesmos distúrbios, podem ainda provocar inúmeras alterações fisiológicas nomeadamente, inflamação, disfunção neurológica e cancro. Realçando a importância da manutenção dos níveis homeostáticos de NO para prevenir desenvolvimento de estados fisiopatológicos. Dado que 70 a 90 % dos níveis plasmáticos de nitritos são resultado da síntese de NO pela eNOS, e consequente oxidação a NO_2^- , torna-se evidente que os nitritos reúnem as características ideais para servir como marcador biológico de NO, com interesse ao nível da identificação de diagnóstico de indivíduos assintomáticos, em risco de doenças cardiovasculares (Bryan, 2006, 2015).

Sabendo que o óxido nítrico NO é responsável pela regulação de vários processos fisiológicos como da pressão sanguínea, respostas imunitária e comunicação neural, e que as alterações nos seus níveis plasmáticos e biodisponíveis, podem estar na base do desenvolvimento de várias condições fisiopatológicas. Então torna-se crucial conhecer os níveis fisiológicos basais de NO na saúde e na doença, para poder identificar antecipadamente os riscos e condições fisiopatológicos, numa fase assintomática (Bryan & Grisham, 2007; Bryan, 2006, 2015; Dejam et al., 2004; Kevil et al., 2011).

A taxa de metabolização do NO é muito rápida, característica que torna a sua identificação em amostras biológicas muito difícil, levando à necessidade de desenvolver estratégias alternativas para a quantificação, de forma precisa e sensível, dos níveis basais de NO. Assim os candidatos ideais para este efeito são os metabolitos do NO, que por sua vez possuem tempos de semivida mais elevados, permitindo a sua deteção, quantificação e consequente extrapolação para os respetivos níveis NO (Bryan & Grisham, 2007; Bryan, 2006).

Inicialmente, as técnicas e métodos de deteção e de quantificação do NO, nomeadamente o ensaio colorimétrico de Griess, mostraram ser tão pouco sensíveis como precisas, não sendo capazes de uma eficiente distinção entre o NO e os seus metabolitos, (Bryan & Grisham, 2007; Kevil et al., 2011). Mais tarde, técnicas de quimiluminescência vieram permitir identificar e quantificar reduzidas quantidades de NO_2^- , bem como de outras espécies nitrosiladas. No entanto, já existem métodos mais eficientes e sensíveis para medição dos metabolitos de NO, nomeadamente a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Bryan & Grisham, 2007; Kevil et al., 2011). A quantificação destes metabolitos, em especial do nitrito, permite a recolha de informação valiosa no que respeita à produção, metabolismo e biodisponibilidade de NO. O facto do nitrato NO_3^- ser estável no corpo humano, exceto quando é reduzido em nitrito pela flora bacteriana oral, faz com que seja pouco útil, para estimar os níveis totais de óxido nítrico no

organismo (Bryan & Grisham, 2007; Bryan, 2006, 2015). Uma revisão recente evidencia que a detecção do nitrito salivar, devido á sua bioatividade e características metabólicas, pode revelar-se um importante método de medida da biodisponibilidade de NO. Na saliva o metabolito NO_2^- reflete bem as alterações consequentes do balanço resultante da produção e consumo de NO (Bryan & Grisham, 2007; Bryan, 2006, 2015).

Os níveis de nitritos salivares, como ilustrado na (**figura 8**), são influenciados por diversos fatores, nomeadamente pelas quantidades de nitratos ingeridas na dieta, quantidades de NO sintetizadas por via endógena, atividade bacteriana da flora oral, ratio de saliva produzida versus ingerida, pH gástrico, ou ainda aumento da metabolização de NO. Deste modo caso haja distúrbios negativos dos níveis biodisponíveis de NO, esse efeito é repercutido na redução proporcional dos níveis de nitritos salivares. Resumidamente qualquer distúrbio deste ciclo irá refletir-se nos níveis de nitritos salivares, com possível indicação de condições fisiopatológicas (Bryan, 2015).

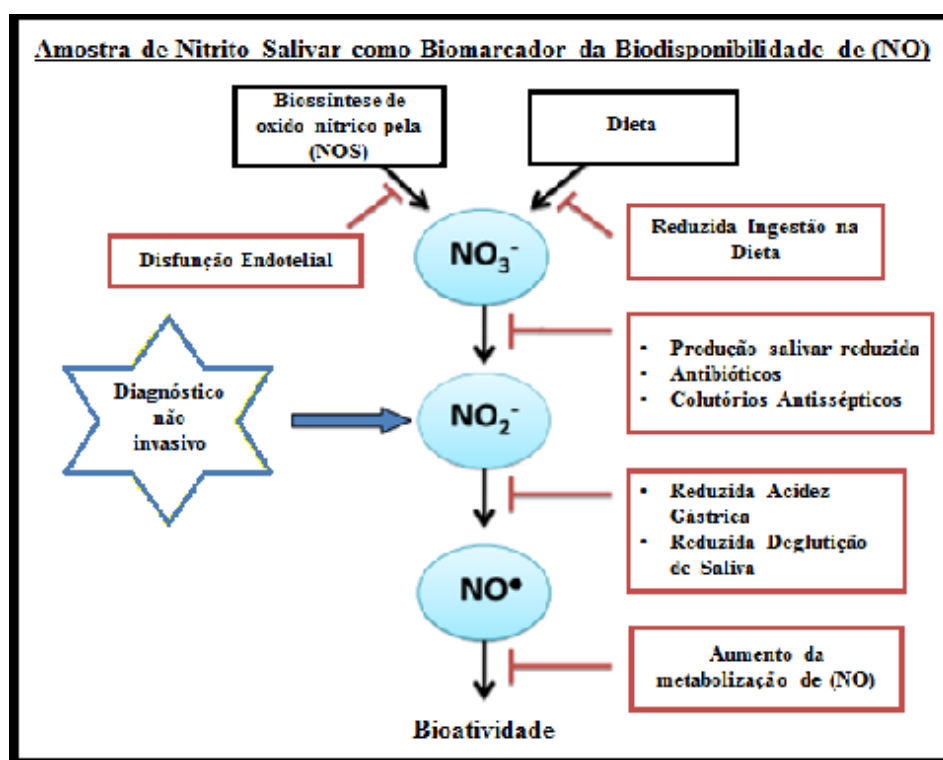


Figura 8 - Amostra de nitrito salivar como marcador da biodisponibilidade de NO. Adaptado e traduzido de: (Bryan, 2015)

A amostra salivar, por ser de simples recolha e não invasiva, adicionalmente ao facto de refletir de forma mais aproximada os níveis de NO totais, oferece várias vantagens relativas aos outros compartimentos biológicos de diagnósticos, como plasma e sangue. No entanto está longe de ser perfeita, na medida em que uma pessoa que

apresente disfunção endotelial deveria apresentar valores elevados de nitritos salivares, mas caso ingira uma alimentação rica em nitratos, pode falsear os níveis de nitritos observados na saliva, que se verificam aumentados (Bryan, 2015).

Assim, quando as suas variáveis e limitações vierem a ser melhor compreendidas, o método de diagnóstico do biomarcador nitrito, pode vir a fornecer informações vitais relativas ao estado de saúde, bem como presença de riscos cardiovasculares, mesmo em doentes assintomáticos, permitindo uma abordagem terapêutica muito mais precoce, e com melhores prognósticos (Bryan & Grisham, 2007; Bryan, 2006, 2015; Dejam et al., 2004).

4. Potencial terapêutico do nitrito inorgânico

A aplicação terapêutica corrente que tem sido atribuída ao nitrito inorgânico sob a forma de nitrito de sódio, é a de antídoto contra intoxicações por intermédio de cianeto e ou sulfureto de hidrogénio. Estes tóxicos, têm uma elevada afinidade para se ligarem a ferro ferroso (Fe^{2+}), e nomeadamente ao citocromo C oxidase mitocondrial, repercutindo-se na inibição da respiração celular. Tal facto, manifesta-se numa toxicidade ao nível tecidular, uma vez que as células ficam incapazes de utilizar o (O_2) e, dependentemente da via de intoxicação e do tempo de exposição, os sintomas podem variar desde uma simples irritação aérea até à morte, em poucos minutos (Kevil et al., 2011; Omar et al., 2012).

A administração terapêutica de 300 mg de nitrito de sódio, numa taxa de perfusão de 30mg/ml, provoca a formação de metahemoglobina. Como esta também tem uma elevada afinidade para o cianeto, compete com a oxidase do citocromo C por este ligando, dando origem a ciano-metahemoglobina, e desta forma, reduzindo a inibição da respiração celular ao nível da mitocôndria. No entanto não se pode considerar que o nitrito seja um antídoto muito eficiente, nem com muita relevância, pois comparativamente a outros antídotos, tem uma taxa de formação de (metHb) significativamente lenta, o que faz com que o seu uso em situações urgentes não seja possível. (Kevil et al., 2011).

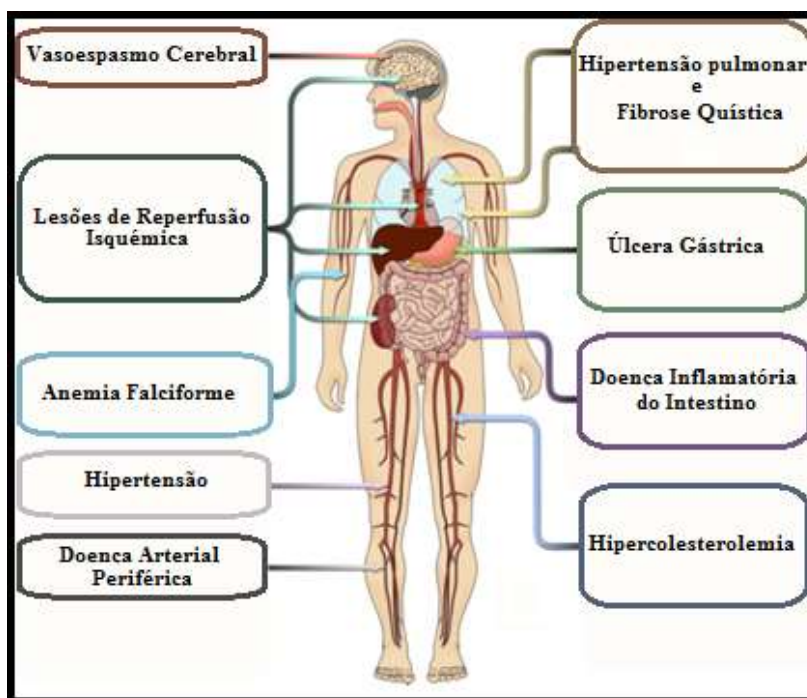


Figura 9 - Potencial terapêutico do nitrito inorgânico. Adaptado e traduzido de: (Kevil et al., 2011)

Nos últimos anos, os nitritos inorgânicos têm vindo a ganhar terreno na área terapêutica, nomeadamente, no tratamento e prevenção de condições fisiopatológicas como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e ou infecciosas (**figura 9**). Como irá ser desenvolvido neste capítulo, especificamente doenças associadas a reduções dos níveis tecidulares de oxigénio (O_2), que provoquem uma redução do pH, ou ainda que bloqueiem o fluxo sanguíneo, definem os principais alvos terapêuticos dos nitritos (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Apesar de os nitritos inorgânicos terem sido investigados intensivamente nos últimos anos, e demonstrado um grande potencial terapêutico, há evidências da utilização terapêutica destes na antiguidade. No início do séc. XX foi encontrado um manuscrito budista, que data um período de aproximadamente 1000 anos atrás, evidenciando utilizações destes compostos no tratamento nas dores cardíacas agudas e na regulação e aumento da temperatura corporal (Lundberg et al., 2008).

4.1- Potenciais aplicações terapêuticas em patologias cardiovasculares

4.1.1- Hipertensão

A hipertensão ou a elevação da pressão sanguínea é uma condição, perante a qual os vasos sanguíneos estão constantemente sujeitos a pressões elevadas. É medida em milímetros de mercúrio (mmHg), com base em dois valores, a pressão sistólica e a diastólica, que correspondem, respetivamente, á pressão máxima e mínima, observadas durante a contração e relaxamento do coração. Considera-se hipertensão, quando os valores de pressão sistólica e diastólica se elevam para valores maiores do que 140 (mmHg) e 90 (mmHg) respetivamente (World Health Organization, 2013).

Deste modo, quanto mais elevada estiver a pressão arterial, maior será o trabalho exercido pelo coração para fazer chegar o sangue ao resto dos tecidos, pois há uma maior resistência oferecida pelos vasos durante esse transporte. Apesar de em condições precoces não causar sintomas, e haver um elevado número de pessoas não diagnosticadas, a hipertensão pode em casos mais graves, conduzir a uma série de complicações como valvulopatias, falência cardíaca, hiperplasia e enfarte do miocárdio, desenvolvimento de aneurismas, AVC, falência renal e ou cegueira (World Health Organization, 2013).

Em 2008, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, o número de pessoas diagnosticadas com hipertensão subiu de 600 milhões para 1 bilião, sendo que as

complicações derivadas da hipertensão, foram responsáveis por mais de 9.4 milhões de mortes ao nível mundial, nesse mesmo ano. Caso seja detetada a tempo e seja efetuado um tratamento eficiente e antecipado, pode-se evitar intervenções mais dispendiosas e invasivas como *bypass* cardíaco, cirurgia da artéria carótida ou hemodialise (Department of Health Statistics and Informatics, 2011; World Health Organization, 2013). Neste sentido, os nitritos inorgânicos tem vindo a ser intensivamente investigados ao longo dos últimos, numa tentativa de poderem vir a fornecer mais uma alternativa terapêutica na área da vasodilatação, com consequente melhoria do fluxo e perfusão sanguínea (Gilchrist, Shore & Benjamin, 2011; Omar et al., 2012).

Ação vasodilatadora:

As propriedades vasodilatadoras do nitrito inorgânico foram sugeridas primeiramente por (Reichert & Mitchell, 1980) que demonstraram que o nitrito de potássio alterava a pulsação arterial de uma forma dependente da dose. Mais tarde, (Furchgott & Bhadrakom, 1953) provaram que o nitrito *in vitro* provocava vasodilatação de pedaços pré-contraídos da artéria aorta de coelho. Já as doses farmacológicas para este efeito foram, propostas posteriormente, por (Modin et al. 2001) onde se verificou que concentrações de nitrito de 200 $\mu\text{mol/l}$ são suficientes para relaxar, *in vitro*, a aorta de rato em condições fisiológicas aeróbicas, enquanto concentrações de apenas 160 $\mu\text{mol/l}$ são necessárias para observar o mesmo efeito em condições de hipoxia (Bailey et al., 2014; Gilchrist et al., 2011).

Já em ensaios *in vivo* realizados por (Cosby et al., 2003; Gladwin et al., 2006), confirma-se que após perfusão de nitritos na artéria braquial, ocorre vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo no braço (**figura 10A**), com formação de metabolitos do óxido nítrico e da hemoglobina. Como ilustrado na (**figura 10B**) verifica-se que fluxo sanguíneo é maior, quando é administrado nitrito concomitantemente, com inibidor da NOS (L-NMMA), do que este ultimo sozinho, comprovando que o nitrito é mediador de vasodilatação e capaz de fornecer NO mesmo quando NOS está inativa. Como a administração de nitrito em esforço físico, provoca um aumento mais acentuado do fluxo sanguíneo comparativamente à administração de nitrito em repouso, este resultado demonstra que a redução do nitrito em NO, e a sua ação vasodilatadora, são potenciadas em hipoxia ou esforço físico (**figura 10B**). Visto que houve formação de produtos da reação com a hemoglobina, e que a taxa de formação destes é inversamente proporcional

a taxa de saturação de (oxiHb), foi também possível inferir que a (desoxiHb) é responsável pela redução do NO_2^- em NO (Cosby et al., 2003; Gladwin et al., 2006).

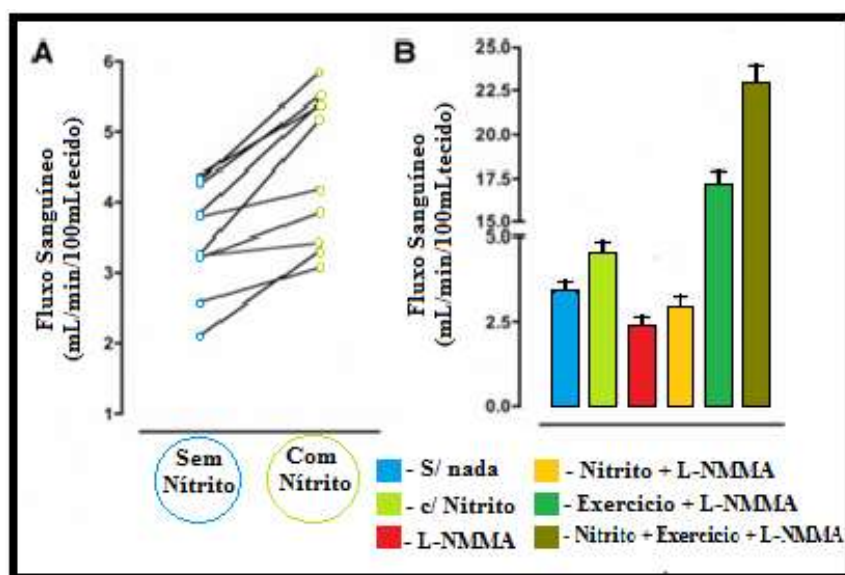


Figura 10 A - Influência do nitrito no aumento do fluxo sanguíneo B- Influencia da NOS e do exercício físico, na vasodilatação mediada pelo nitrito. Adaptado e traduzido de: (Cosby et al., 2003; Gladwin et al., 2006)

Num estudo realizado por Maher et al. em (2008), com o objetivo de testar a hipótese de que a taxa de redução do nitrito variava de acordo com a tensão de oxigênio $P(\text{O}_2)$, e se o efeito de vasodilatação aumentava consequentemente, á medida que estas tensões iam diminuindo. Com os resultados obtidos neste estudo foi possível demonstrar que o nitrito é um potente vasodilatador em normóxia e em hipoxia, e que em condições fisiológicas, a sua ação vasodilatadora nas artérias e vasos de resistência é modesta, mas é acentuada nas veias e vasos de capacidade. Por outro lado, em hipoxia, o nitrito revela-se um potente vasodilatador das artérias e vasos de resistência. Isto deve-se ao fato de que durante condições fisiológicas normais, existe uma menor tensão de oxigênio $P(\text{O}_2)$ nos vasos de capacidade, onde circula sangue venoso, do que nos de resistência onde flui sangue arterial. Já em condições de hipóxia a $P(\text{O}_2)$ diminui mais acentuadamente nos vasos de resistência em comparação ao estado fisiológico normal. Estes resultados reforçam as evidências anteriores já referidas atrás que as tensões de oxigênio desempenham um importante papel na determinação da resposta vasodilatadora (Maher et al., 2008; Bailey et al., 2014).

Atualmente é consensual que o nitrito em situações de hipoxia, pode atuar como precursor de NO, e mediar indiretamente a vasodilatação, através da ativação da sGC e

aumento dos níveis de cGMP, com consequente diminuição dos níveis de cálcio intracelular. (Bailey et al., 2014; Omar et al., 2015). Porém ainda existe alguma controvérsia no que toca ao seu mecanismo de ação vasodilatador, pois não foi ainda possível, explicar como o NO escapa a metabolização sanguínea após redução do nitrito, uma vez que o seu tempo de semivida no sangue é de aproximadamente 2 μ s. Por outro lado, ainda não foi descrito nem há conhecimento da existência de recetor do nitrito na parede endotelial. As evidências disponíveis até á data sugerem que o nitrito, não consegue exercer bioatividade antes de ser reduzido em NO ou outros metabolitos (Bailey et al., 2014; Gladwin et al., 2006).

A hipertensão pulmonar, anemia falciforme, e vasoespasmo cerebral retardado, são condições fisiopatológicas, que são agravadas pela hipertensão, sendo que as propriedades vasodilatadoras do nitrito podem conferir efeitos terapêuticos, nestas situações patológicas em particular (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Hipertensão Pulmonar:

A hipertensão pulmonar (HP) é uma condição caracterizada pela elevada resistência vascular pulmonar, que se manifesta por níveis sistémicos de (O_2) reduzidos (hipoxia). Em casos graves pode levar à disfunção ventricular direita, redução *output* cardíaco e morte (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008). Ensaios efetuados em animais com (HP), comprovou-se que os nitritos e o óxido nítrico têm ação vasodilatadora pulmonar seletiva, pois reduzem a vasoconstrição pulmonar induzida pela hipóxia característica desta patologia, em modelos ovinos. Comparativamente ao efeito com o nitrito, o NO teve maior rapidez de ação mas menor duração do efeito, enquanto por outro lado, o efeito vasodilatador do nitrito foi mais prolongado (60min) e não se observou alterações ao nível da pressão sanguínea sistémica (Bueno et al., 2012).

Já em ensaios efetuados em modelos de roedores, no sentido de avaliar também o potencial do nitrito na (HP) por administração sistémica. Verificou-se que ao contrário do nitrito inalado, o nitrito de sódio sistémico tem a capacidade de provocar vasodilatação da circulação pulmonar, bem como da circulação sistémica (Bueno et al., 2012).

Anemia falciforme:

A anemia falciforme, caracteriza-se pela oclusão dos vasos sanguíneos, pelos eritrócitos falciformes, que por sua vez provocam vasoconstrição e aumento pressão arterial. Uma vez que pacientes com esta doença, apresentam pré-disponibilidade para

desenvolver (HP) á medida que envelhecem. Foram realizados ensaios com o objetivo de avaliar a potencialidade terapêutica do nitrito nesta condição, e constatou-se que apesar deste provocarem vasodilatação, no que diz respeito elevação do fluxo sanguíneo, estes pacientes respondem de forma menos significativa aos nitritos, relativamente aos controlos saudáveis (Bueno et al., 2012).

Vasoespasma cerebral retardado:

Por último, alguns trabalhos indicam que os nitritos, podem ajudar a prevenir a vasoespasma cerebral tardio após hemorragia espontânea do aneurisma da artéria subaracnoídea. Quando não é fatal, nos períodos após o derrame, verifica-se diminuição do fluxo sanguíneo na artéria cerebral média, devido ao seu estreitamento. Vários estudos indicam que o espasmo vascular ocorre devido á reduzida biodisponibilidade de NO e NO₂⁻ no fluido espinal cerebral. No entanto, em ensaios com modelos de primatas, a administração por via sistémica de nitrito durante 2 semanas, resultou na prevenção do vasoespasma, bem como na redução dos danos provocados pela isquemia, como será explicado com maior detalhe no próximo subcapítulo, noutras patologias que também se caracterizam por lesões isquémicas (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Dieta na redução da hipertensão:

De acordo com um jornal da organização mundial de saúde (World Health Organization, 2013) uma má dieta, consistindo numa alimentação desequilibrada, com reduzida ingestão de vegetais e frutos acompanhado de um elevado consumo de gorduras e sal, engloba uma das principais causas de hipertensão. Que por sua vez é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento ou agravamento de doenças cardiovasculares.

Estudos efetuados por (A. J. Webb et al., 2008) na tentativa de avaliar os possíveis benefícios cardiovasculares duma dieta rica em nitratos e nitritos, verificou-se que 3 horas após a ingestão de uma sobrecarga dietética de nitratos em voluntários saudáveis, observou-se uma redução significativa da pressão sanguínea, bem como uma redução da agregação plaquetar e prevenção da disfunção endotelial. Estes efeitos confirmam-se, uma vez que a interrupção da circulação enterosalivar e consequente a inibição da redução do nitrato, resultou na inexistência da redução da pressão sanguínea, bem como na ausência de efeito inibitório sobre a agregação plaquetar, demonstrando que a alimentação rica em frutos e vegetais é uma importante fonte de nitritos, representando

uma série de benefícios na saúde cardiovascular, nomeadamente na hipertensão (Hord et al., 2009; Kapil et al., 2010; Lundberg et al., 2011; Machha & Schechter, 2011; A. J. Webb et al., 2008).

4.1.2 - Citoproteção em lesões de reperfusão isquémica

A inibição ou bloqueio do fluxo sanguíneo num tecido, que provoque um desequilíbrio entre o fornecimento de (O_2) e a sua carência, denomina-se isquémia. As lesões de reperfusão isquémica são uma componente determinante na patogenicidade de várias doenças cardiovasculares, sendo ainda responsáveis pela mortalidade e morbilidade, após situações de restrição ou bloqueio da circulação sanguínea, enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e ou cirurgias (Frank et al., 2012; Murillo, Kamga, Mo & Shiva, 2011). Por norma, os métodos usados para a redução ou prevenção deste efeito, baseiam-se na devolução do fluxo sanguíneo ao tecido em isquémia. No entanto, o aumento da perfusão no tecido após isquémia, resulta controversamente, na exacerbação do processo isquémico e consequentes danos adicionais. Este fenómeno denominou-se então de, lesões de reperfusão isquémica (I/R), ou seja, são lesões provocadas por isquémia ou pela reperfusão sanguínea, num dado tecido. Em estudos efetuados em modelos animais, verificou-se que após, enfarte agudo do miocárdio, 50% dos casos desenvolviam este tipo de lesões (Frank et al., 2012).

Para além do miocárdio, este processo também pode ocorrer noutros tecidos como é o caso do fígado, rim e cérebro. Especificamente no cérebro da mesma forma situações como inibição ou bloqueio da circulação sanguínea, e ou acidente vascular cerebral por oclusão trombótica ou por rutura vascular, podem provocar posteriormente episódios isquémicos com consequentes danos neurológicos e défices cognitivos (Sanderson, Reynolds, Kumar, Przyklenk & Huttemann, 2013).

Em conjunto, a disfunção endotelial e mitocondrial são responsáveis pela progressão das lesões de reperfusão isquémicas. Na disfunção endotelial, observada em (I/R), produzem-se moléculas de adesão, que por sua vez, induzem a migração e adesão de leucócitos para a zona em isquémia, iniciando desta forma, as lesões tecidulares (Murillo et al., 2011). Tal facto foi comprovado por ensaios que demonstram que o silenciamento da expressão da eNOS exacerba as lesões de (I/R), enquanto a sua sobre-expressão previne e protege o desenvolvimento destas lesões (A. Webb et al., 2004). A

nível celular, a disfunção da mitocôndria é responsável pelos danos provocados durante os períodos de isquemia bem como de reperfusão, através da depleção de adenosina trifosfato ATP, e da produção de grandes quantidades de ROS, provocando lesões nos componentes celulares, induzindo a apoptose e ou a necrose celular (Murillo et al., 2011; Sanderson et al., 2013; Shiva & Gladwin, 2009).

Ação citoprotetora e reguladora dos consumos de O₂:

Já o óxido nítrico e mais recentemente os nitritos, estão a ser reconhecidos como moduladores da função mitocondrial e endotelial, e conceder desta forma citoproteção durante e após os períodos de (I/R), característicos, em patologias como o acidente vascular cerebral (AVC), enfarte agudo do miocárdio (EAM), e vasoespasma cerebral (Calvert & Lefer, 2009; Dezfulian, Raat, Shiva & Gladwin, 2007; Murillo et al., 2011; Shiva & Gladwin, 2009; Shiva et al., 2007; A. J. Webb et al., 2008).

Em normóxia (**Figura 11**), o NO sintetizado pela NOS, pode ativar a via de cGMP induzindo a vasodilatação ou então atuar na mitocôndria inibindo a oxidase do citocromo C ou complexo IV, que por sua vez é o ultimo aceitador de eletrões da cadeia transportadora. A ligação do NO ao complexo (IV), leva à utilização alternativa do (O₂) noutros alvos, causando a produção de ROS e danos celulares consequentes do *stress* oxidativo (Lundberg et al., 2009). Por outro lado em hipoxia ou (I/R), o NO já não é sintetizado pela NOS devido a depleção de (O₂) e cofatores. Sendo que o nitrito pode ser reduzido pela forma desoxigenada da mioglobina, oxiredutase da xantina, ou ainda por enzimas da cadeia transportadora de eletrões (ETC), originando NO, que inibe a respiração no complexo (IV), e regula desta forma os gradientes e consumos de oxigénio pela mitocôndria, como ilustrado na (**Figura 11**). Em reforço o nitrito pode atuar diretamente no complexo (I) da cadeia transportadora da mitocôndria por S-nitrosilação, e inibir desta forma a síntese de ROS, mediando citoproteção durante a reperfusão (Lundberg et al., 2009).

Estudos efetuados por (Larsen, Weitzberg, Lundberg & Ekblom, 2007) suportaram esta ideia ao demonstrar a redução dos consumos de oxigénio em todo o corpo, em jovens voluntários saudáveis durante exercício físico intenso, após suplemento de nitrato de sódio, comparativamente ao grupo placebo.

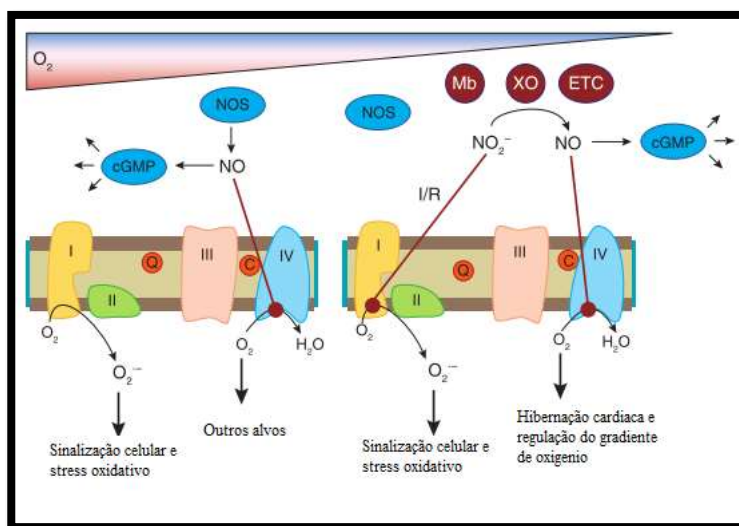


Figura 11 - Ação citoprotetora do óxido nítrico e do nitrito na mitocôndria comparativamente à hipoxia. Adaptado de (Lundberg et al., 2009)

Segundo (Shiva & Gladwin, 2009) o nitrito é a terapêutica ideal neste tipo de lesões e situações de (I/R), pois é o único entre os inibidores do complexo (I), que não inibe a sua atividade em normóxia. Para além disso, ainda atua de forma reversível, devido à modificação proteica por S-nitrosilação ser meramente temporária, este é vantajoso, uma vez que a sua irreversibilidade significaria interromper permanente a produção de ATP e consequente morte celular (Shiva & Gladwin, 2009). Apesar da oxiredutase da xantina, ser normalmente responsável por reduzir o (O_2) em superóxido, o qual provoca danos celulares contribuindo para o *stress* oxidativo. No entanto o nitrito em condições de hipoxia, compete com o substrato (O_2) pela ligação à XOR, sendo desta forma reduzido a NO, e conferindo simultaneamente citoproteção em alternativa aos danos tecidulares que a XOR causaria, caso não houvesse NO_2^- presente (A. Webb et al., 2004).

Para comprovar que a administração de nitritos exógenos produzia realmente efeitos citoprotetores, e consegue limitar a extensividade das lesões de reperfusão isquémica, foram realizados ensaios por (A. Webb et al., 2004) num modelo de coração de rato isolado numa preparação de langendorff, para avaliar a resposta fisiológica perante a administração de nitritos com e sem inibidor enzimático da XOR. Os resultados obtidos evidenciaram que perfusões com concentrações de (10 a 100 μM) sem inibidor enzimático, reduziram a incidência de enfarte do miocárdio de $47.3 \pm 2.8\%$ para $17.9 \pm 4.2\%$ e $17.4 \pm 1.0\%$ respetivamente, enquanto a administração do inibidor enzimático impediu a redução do nitrito, e consequentemente a redução da incidência EAM.

Adicionalmente, ainda foram observados resultados relevantes a respeito da recuperação da função ventricular esquerda (A. Webb et al., 2004).

Angiogénese:

A promoção ou estimulação da angiogénese também pode ser uma das estratégias terapêuticas a adotar em situações de lesão pós isquemia, como o acidente vascular cerebral (AVC), enfarte agudo do miocárdio (EAM), ou a doença arterial periférica. Nestas situações, o NO derivado da redução do nitrito induz formação de novos vasos necessários ao tecido lesado, devido ao período, que o este esteve em isquémia. (Förstermann & Sessa, 2012; Jia & Sowers, 2014). Para desempenhar esta função o NO ativa as vias de sinalização (cGMP/PKG); (Ras/Raf); e (MAPK), induz a migração das células endoteliais estimulando a sua proliferação, e aumentando a expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Este último, por sua vez, tem a capacidade recíproca de potenciar a síntese de óxido nítrico pela eNOS, bem como promover a angiogénese de uma forma NO dependente. (Jia & Sowers, 2014).

Neste aspeto em particular, a aplicação terapêutica do nitrito, seria de especial interesse, uma vez, que este ao contrário de outros fármacos doadores de NO. O NO_2^- é altamente seletivo para situações isquémicas, não representando consequências indesejadas como cianose, retinopatia, hipotensão, e principalmente potenciação da angiogénese tumoral (Jia & Sowers, 2014).

Ação antiagregante plaquetar:

Por último, o NO derivado da redução do nitrito pode ainda contribuir para o tratamento ou prevenção da extensão das lesões, em episódios isquémicos, ao inibir a formação de trombos e consequente bloqueio dos vasos. Ensaio realizados *in vitro*, evidenciaram que concentrações de (0.1 μM) provocam inibição da ativação da agregação de plaquetas humanas, sendo que esta ação é potenciada pela diminuição dos níveis de O_2 , e pela presença de eritrócitos, sugerindo que existe uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos de nitritos e a atividade/ agregação plaquetar. (Park, Piknova, Huang, Noguchi & Schechter, 2013).

Este efeito é conseguido através bioativação do NO_2^- em NO, o qual, é um potente inibidor da agregação plaquetar, e por via da por ativação da sGC, estimula a produção cGMP, provocando mobilização do cálcio intracelular e consequente inibição da atividade das plaquetas (Park et al., 2013).

4.1.3 - Doença arterial periférica (DAP)

A doença arterial periférica (DAP) é uma condição provocada classicamente por eventos patológicos como trombose, vasculite e aterosclerose, caracterizada por um bloqueio ou oclusão generalizada dos membros inferiores e superiores. A aterosclerose é o mediador patológico principal do desenvolvimento de DAP. Sendo que o seu tratamento é crucial no tratamento coincidente da DAP (Pattillo, Bir, Rajaram & Kevil, 2011).

O processo fisiopatológico da aterosclerose cíclico e difícil de inverter, pois está associado a uma exacerbação inflamatória vascular, com recrutamento de leucócitos e plaquetas que vão aderir às paredes do endotélio, e provocar estreitamento do diâmetro vascular e consequente disfunção endotelial. Esta última, por sua vez, manifesta-se na redução dos níveis de NO, que facilita a adesão leucocitária e agregação plaquetar, agravando desta maneira a DAP (Pattillo et al., 2011).

Apesar da DAP costumar ser uma doença incidente na população idosa, devido aos maus hábitos alimentares e sociais, no entanto está a ser diagnosticada mais frequentemente, na população abaixo dos 40 anos de idade. Ao contrário das doenças cardiovasculares (DCV), a incidência da DAP continua a aumentar (Pattillo et al., 2011).

Assim, dado que a DAP é uma condição com poucas alternativas terapêuticas, cuja sua incidência está a aumentar. Em adição ao facto, de representar um risco para o desenvolvimento de outras DCV e contribuir para a sua morbilidade e mortalidade, torna-se então urgente encontrar alternativas terapêuticas eficientes para a resolução desta patologia (Kumar et al., 2008; Pattillo et al., 2011).

Os nitritos inorgânicos, como precursores de NO em hipóxia, podem vir a fornecer uma boa solução terapêutica, pois o aumento da disponibilidade de NO ajuda em atenuar a disfunção endotelial, estimulando a angiogénese, e inibindo a aderência leucocitária e plaquetar à parede vascular (Förstermann & Sessa, 2012). A inibição da adesão leucocitária é conseguida, uma vez que o NO tem a capacidade de inibir ou silenciar a expressão da proteína CD11/CD18. Que é responsável pela adesão dos leucócitos à parede endotelial. Já a agregação plaquetar é diminuída através da ativação da via de sinalização da sGC, e em conjunto estas duas respostas conduzem à redução e prevenção da formação de placas de ateroma (Förstermann & Sessa, 2012).

4.2 - Formulações do nitrito e vias de administração

Visto que os nitritos inorgânicos apresentam um grande potencial como estratégia terapêutica em diversas patologias, a dosagem e tipos de formulações a utilizar bem como as diferentes vias de administração, podem divergir conforme seja a ação farmacológica desejada, tipo de patologia e local de ação (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Relativamente à via de aplicação tópica, os nitritos inorgânicos podem ser formulados sob a forma de sal em nitrito de sódio (NaNO_2), e posterior mistura com um composto acidificante como o ácido ascórbico. Esta fórmula resulta numa rápida libertação de NO, que confere propriedades bactericidas e antissépticas. Sendo que a sua aplicação tópica apresenta efetividade comprovada no tratamento de várias infeções da pele (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Já a aplicação tópica nas vias aéreas, de nitrito de sódio por nebulização, apresenta efetividade bactericida contra *pseudomonas* no tratamento da fibrose quística em modelos animais. Neste tipo de via de administração inalatória, a ação farmacológica do nitrito restringe-se seletivamente ao pulmão (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Uma das infeções nosocomiais do trato urinário mais comuns, é a da cistite provocada pela colonização bacteriana do cateter urinário. Com o sentido de melhorar este facto, foram realizados estudos na tentativa de utilizar o balão de retenção deste cateter como depósito e método de entrega intravesicular do nitrito acidificado, permitindo a prevenção e o tratamento destas infeções. Em estudos *in vitro* o NO foi formado no balão de retenção, difundiu-se na urina infetada onde eliminou o patógeno *escherichia coli* (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Quanto à administração entérica, há vários factos e evidências que comprovam que o nitrito pode ser administrado por via oral sem perder bioatividade. Pois ao contrário dos nitratos orgânicos, estes não sofrem efeito de primeira passagem hepática. No entanto a sua biodisponibilidade pode ser variável, pois está intimamente dependente de várias condições como redução pela flora bacteriana e pelo pH gástrico, sendo que os distúrbios destes, influencia e reflete-se imediatamente nos níveis de nitritos bio disponíveis (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008). Faz ainda sentido combinar a administração concomitante de sais de nitratos e de nitritos por via oral, pois este último iria provocar efeitos imediatamente após a absorção, que é interessante para obter tempo de ação rápido, enquanto o nitrato iria ser lentamente metabolizado devido à circulação

enterosalivar, e provocar uma duração de ação prolongada (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

Por último o nitrito de sódio pode ainda ser administrado por via sistêmica, e neste caso dependentemente da condição a tratar é necessário adequar e ajustar as doses bem como o tempo de tratamento. Enquanto na prevenção do vasoespasma cerebral, em modelos animais, são necessários elevadas doses de nitritos e longos tempos de tratamento, para obter efeito benéfico visível, por outro lado no tratamento de lesões de reperusão isquêmica são suficientes doses pequenas para se observar citoproteção (Bueno et al., 2012; Lundberg et al., 2008).

4.3 - Toxicidade e efeitos adversos dos nitritos

Desde há muito tempo os nitratos e nitritos são reconhecidos pela sua potencial toxicidade, associada à formação de *S*-nitrosaminas carcinogénicas ou pelo risco de metahemoglobinemia em recém-nascidos, também denominada cianose ou “*Blue baby syndrome*”. Porém, a efetiva responsabilidade do nitrito nestes efeitos tem vindo a ser posta em causa, sendo, atualmente, tema de controversa. Apesar dos avanços nas pesquisas biomédicas e de resultados recentes demonstrarem que os nitritos têm potenciais efeitos benéficos, continua a ser atribuída uma pesada carga negativa a estes compostos (Bailey et al., 2014; Lundberg et al., 2008; Powlson et al., 2008; Yamasaki et al., 2014).

O potencial perigo tóxico do nitrito proveniente da dieta baseia-se então na sua capacidade de oxidação do ferro ferroso (Fe^{2+}) da hemoglobina para ferro férrico (Fe^{3+}), resultando na formação de metahemoglobina (metHb). Esta, por sua vez, não se consegue ligar ao oxigénio, provocando hipoxemia e cianose (Greer & Shannon, 2005). Os recém-nascidos estão particularmente predisponíveis à intoxicação por metHb, pois apresentam uma reduzida atividade da metahemoglobina redutase (Yamasaki et al., 2014). A correlação entre o nitrito e a ocorrência de meta-hemoglobinemia nos recém-nascidos é suportada por estudos efetuados em 1940, onde se mostrou que a preparação de leite com água contaminada com nitratos é a causa do *blue baby syndrome*. Após redução bacteriana e absorção gastrointestinal, o nitrito na corrente sanguínea reage com a (oxiHb) com consequente formação de metHb, agente responsável pela cor azulada da pele (Bailey et al., 2014; Greer & Shannon, 2005; Powlson et al., 2008; Yamasaki et al., 2014). O pediatra Hunter Conly (1945), verificou que a meta-hemoglobinemia não era causada

diretamente pela contaminação de nitritos mas sim pela contaminação por bactérias fecais presentes nas águas rurais, tendo relacionado a incidência deste síndrome com a utilização de águas de poços e fontes aquíferas contaminadas, em locais próximos de pecuárias, enquanto a preparação de leites com água engarrafada prevenia a cianose (Powlson et al., 2008; Yamasaki et al., 2014).

Desta forma, têm sido efetuados, vários ensaios de toxicidade e exames cinéticos prospectivos em modelos animais, com o objetivo de avaliar a segurança do nitrito, quando administrado por via oral e sistêmica, por períodos de tempo prolongados (Hezel et al., 2015; Kevil et al., 2011; Powlson et al., 2008). Assim, Cornblath e Hartmann (1948) administraram, por via oral, doses entre 175 e 700 mg de nitratos em crianças e adultos e constataram que, em nenhuma das dosagens se observou elevação superior a 7.5% dos níveis (metHb), sugerindo que o nitrato sozinho não formava metHb (Powlson et al., 2008).

Em concordância, Pluta et al. (2011) verificaram que perfusões agudas de nitrito de sódio eram bem toleradas até doses de 267 µg/kg/h, e que doses de 466 µg/kg/h, estabeleciam a dose limite, observando-se efeitos assintomáticos, com descida da pressão arterial média (PAM) e elevação dos níveis de metHb em 5%. Desta forma, os autores afirmaram que o nitrito de sódio pode ser administrado por via sistêmica de forma segura, nas dosagens definidas, por longos intervalos de tempo (Bailey et al., 2014).

Segundo (Lundberg et al., 2008), o EC50 do nitrito em humanos, ou seja concentração de nitrito necessária para se observar metade do efeito máximo (formação de metHb), é de 1 g. Em reforço, estimativas com base em extrapolações da informação recolhida através de estudos em animais, indicam que as doses necessárias no humano para o tratamento do enfarte do miocárdio seriam apenas 40 mg num adulto de 70 kg, referindo ainda que a elevação de metHb nesta situação não é detetável, pelo que o risco de metahemoglobinemia por ingestão de nitritos pode ser negligenciável (Lundberg et al., 2008).

No entanto, ainda existem preocupações relativas ao potencial carcinogénico do nitrito, devido ao facto de este, quando utilizado no processo de cura alimentar e durante a confecção de alimentos, conduzir à formação de nitrosaminas carcinogénicas,. Contudo, estudos epidemiológicos extensivos em animais indicaram que a ingestão nitritos, não induz a carcinogénese (Yamasaki et al., 2014). Por outro lado, de acordo com Powlson et al. (2008), foram efetuados, desde 1973, cerca de 50 estudos epidemiológicos com o objetivo de avaliar a relação existente entre a incidência e mortalidade do cancro gástrico,

e a ingestão de nitrito pela dieta. No entanto, em nenhum destes estudos, se encontrou evidências significativas que indicassem que o nitrito provocasse ou agravasse o cancro gástrico.

Muito recentemente (Bouvard et al., 2015; World Health Organization, 2015) o efeito carcinogénico do consumo de carnes vermelhas e de carnes processadas foi avaliado, tendo-se classificado estes alimentos como carcinogénicos para o Homem, pois a a confeção destes alimentos a altas temperaturas (grelhados ou fritos), libertam compostos carcinogénicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas heterocíclicas. Já o processamento destas carnes (salga, cura, defumação e fermentação) pode resultar na formação de compostos *N*-nitrosos potencialmente carcinogénicos. Na tentativa de investigar a associação entre o cancro e consumo de carnes vermelhas, bem como de carnes processadas, o grupo acedeu a 800 estudos epidemiológicos,. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se uma associação positiva com o cancro colonoretal, gástrico, pancreático e da próstata. A análise do cancro colonoretal em 10 estudos *cohort*, evidenciou uma correlação estatisticamente significativa, na medida que se observou um aumento em 17% do risco associado a este cancro com o consumo médio diário de 100g de carne vermelha, e de 18% quando são consumidos em média por dia 50g de carne processada (Bouvard et al., 2015; World Health Organization, 2015). A análise destes resultados vieram determinar a classificação das carnes processadas como produtos carcinogénicos para o Humano (grupo 1), com base em evidências suficientes para a associação do consumo destes produtos com o cancro colonoretal e gástrico, enquanto que, as carnes vermelhas não processadas foram classificadas como potencialmente carcinogénicas para o humano (grupo 2A), por se verificar uma associação positiva entre o consumo destas e os cancros colonoretais, pancreáticos e da próstata (Bouvard et al., 2015; World Health Organization, 2015).

Embora seja consensual a existência desta associação, e apesar de haver vários compostos suspeitos na carne vermelha capazes de provocar cancro, seja pelo modo de confeção ou pelo tipo de processamento, ainda não foi compreendido de que maneira o consumo destes produtos aumenta o risco de alguns tipos de cancro, não sendo ainda possível explicar qual o agente causal e qual o seu mecanismo de ação (Bouvard et al., 2015; World Health Organization, 2015).

Já Hezel et al. (2015), realizou vários tipos de exames fisiológicos e bioquímicos em modelos animais, na tentativa de desmistificar as preocupações putativas relativas aos efeitos adversos carcinogénicos resultantes da exposição prolongada por nitritos. Para

este efeito, os ratos foram sujeitos a uma suplementação de nitratos na dieta e água, durante 17 meses. Ao longo desse período de tempo, foram avaliados parâmetros como peso e composição corporal, consumo de água e comida, pressão sanguínea, metabolismo da glucose, bem como os gastos de oxigénio (Hezel et al., 2015). No entanto, para além da ausência de efeitos tóxicos, ainda se verificou efeitos benéficos em vários dos parâmetros avaliados, levando à conclusão que a exposição prolongada de nitritos pela dieta em ratos em doses correspondentes, na escala humana, ao limite máximo ingerido por dia pela sociedade ocidental, não é prejudicial à saúde (Hezel et al., 2015).

Adicionalmente, ainda foi comparada a incidência de cancro entre os trabalhadores duma fábrica de fertilizantes derivados dos nitratos, e os trabalhadores duma empresa sem exposição a nitratos. Apesar do primeiro grupo ser exposto de forma superior e prolongada, não se verificou diferenças significativas na incidência do cancro, indicando que o nitrito inorgânico não é agente carcinogénico (Powlson et al., 2008).

Resumidamente, embora os nitritos estejam associados a graves efeitos adversos putativos, informação recolhida até à data, demonstra inexistência de correlação entre a exposição do nitrito e a incidência destes efeitos associados, sejam eles cancro ou cianose (Bailey et al., 2014; Hezel et al., 2015; Kevil et al., 2011; Lundberg et al., 2008; Powlson et al., 2008; Yamasaki et al., 2014).

5. Conclusão

A compreensão do papel fisiológico dos nitritos inorgânicos e da sua relação com os outros óxidos de azoto (nitrato e óxido nítrico), modificou o antigo conhecimento negativamente associado a estes compostos. De facto, a informação reunida ao longo deste trabalho, apresenta uma nova perspetiva biomédica dos nitritos, demonstrando que estes compostos, não são apenas produtos metabólicos do óxido nítrico, mas sim compostos integrantes e ativos no ciclo do NO, regulando a sua biodisponibilidade e tornando possível a sua ação a nível endócrino.

A importância fisiológica do óxido nítrico é conhecida há mais de vinte anos, tendo sido descritas variadas funções ao nível neurológico, imunitário e, principalmente, cardiovascular. No entanto, na íntegra, a biorrelação entre o nitrito e o NO tem sido desconhecida até há relativamente pouco tempo. Com efeito, foi recentemente demonstrado que os nitritos inorgânicos servem de reservatório de NO e que participam no seu metabolismo de forma bidirecional, ou seja, não só são produtos formados pela sua oxidação, como podem ser reduzidos *in vivo*, formando novamente NO em caso de insuficiência por disfunção da biossíntese deste último, devido a fatores fisiopatológicos (e.g. hipoxia). Estas descobertas vieram esclarecer a função fisiológica dos nitritos, desprezada até à data, bem como a sua biorrelação com o NO, revelando desta forma o grande potencial terapêutico do nitrito inorgânico em diversas patologias, especialmente nas doenças cardiovasculares.

Para além dos seus efeitos vasoreguladores e citoprotetores em situações de isquémia, os nitritos inorgânicos podem ser detetados biologicamente, ao contrário do NO, e desta forma podem refletir a biodisponibilidade deste último, sendo assim evidente tanto a sua potencial função terapêutica, bem como a sua potencial aplicação como método de diagnóstico e identificação de diversos estados patológicos associados à insuficiência de óxido nítrico.

Contrariamente aos efeitos putativos associados aos nitritos inorgânicos, recentes estudos epidemiológicos demonstraram fracas evidências que sustentem a hipótese dos nitritos como substâncias tóxicas para o ser humano. Esta afirmação é comprovada e reforçada pelo facto das doses máximas toleradas pelo homem, excederem significativamente as doses necessárias à aplicação terapêutica, de acordo com estudos

toxicológicos e estimativas das doses terapêuticas em humanos, a partir de ensaios em animais.

A dieta como fonte de nitritos e nitratos pode vir a fornecer uma boa via de prevenção para a ocorrência de doenças cardiovasculares. No entanto, não pode ser encarada como via terapêutica uma vez que esta deve ser moderada e equilibrada. Assim, a recomendação da ingestão de nitritos na dieta tem o objetivo exclusivo de impedir a carência destes compostos e nunca deve ser utilizada como suplementação para aumentar os níveis destes, pois o excesso deste ou de qualquer nutriente pode ser prejudicial para a saúde.

Com base nestas informações, conclui-se que os nitritos inorgânicos apresentam de facto um grande potencial biomédico e clínico, quer seja no tratamento de diversas patologias, quer no seu diagnóstico, oferecendo uma potencial solução terapêutica com reduzidos efeitos adversos, ou então conferindo diversos benefícios e prevenindo vários estados patológicos através da sua mera inclusão na dieta alimentar.

6. Perspetivas futuras

O interesse clínico nos nitritos inorgânicos têm vindo a aumentar significativamente, desde a evidência que o nitrito pode ser reduzido *in vivo* por várias vias, de uma forma dependente das tensões de oxigénio e do pH (Lundberg et al., 2008). Estas evidências vieram demonstrar que o nitrito afinal tem bioatividade, podendo atuar como mediador da biodisponibilidade de NO em vários estados fisiopatológicos, e desta maneira representar uma potencial alternativa terapêutica, de forma seletiva e com poucos efeitos adversos, numa variedade de doenças e diversas condições patológicas (Kevil et al., 2011; Vitturi & Patel, 2011).

A razão que despoletou no nitrito, tanto interesse ao longo destes últimos anos, foi o facto das vias de redução do NO_2^- , serem ativadas em situações patológicas e de hipoxia, onde a biossíntese endógena fica disfuncional, e desta forma assegurar uma via alternativa para a manutenção da biodisponibilidade de NO (Vitturi & Patel, 2011). Para além disso as evidências que os nitratos e nitritos, podem ser fornecidos em grandes quantidades na dieta, contribuíram para o aumento do seu valor e interesse clínico, na medida que a ingestão moderada e equilibrada destes compostos na dieta podem ajudar a prevenir o desenvolvimento de estados fisiopatológicos (Kapil et al., 2014; Vitturi & Patel, 2011).

No entanto ainda há varias questões a responder no que diz respeito ao mecanismo de ação do nitrito, bem como do seu metabolismo. Apesar de varias enzimas mostrarem capacidade de redução do nitrito *in vitro*, não significa que tenham eficiência e relevância terapêutica *in vivo* (Vitturi & Patel, 2011). Assim, ainda existe alguma controvérsia relativamente aos mecanismos de ação. No sentido que não se sabe como o NO escapa á metabolização pelos eritrócitos, sendo que também não há evidências da ação direta do nitrito, uma vez que ainda não foi descoberto nenhum recetor no endotélio (Bailey et al., 2014).

Assim ainda ficam por responder várias questões farmacocinéticas e farmacodinâmicas, para uma possível administração segura e eficiente do nitrito. É nesse sentido que é necessário desenvolver e realizar ensaios clínicos adequados, de modo a poder responder a estas questões e assim elucidar acerca da real aplicação do nitrito nas diferentes patologias. E caso se confirme este potencial, poder desenhar de forma

assertiva, estratégias terapêuticas eficazes e seletivas (Kevil et al., 2011; Vitturi & Patel, 2011).

Com este sentido foram realizados este ano ensaios clínicos de fase II em 80 pacientes com EAM, onde se verificou-se que a administração de nitrito de sódio durante a intervenção coronária percutânea e antes da abertura do balão cateterizado, não reduziu a dimensão do enfarte do miocárdio mas teve efeitos notórios no aumento do índice de recuperação da lesão pós enfarte bem como reduziu bastante os eventos adversos cardíacos (Jones et al., 2014). Em pacientes sujeitos a trombólise, para além dos efeitos citoprotetores verificou-se ainda uma redução da dimensão do enfarte do miocárdio. Estes resultados vieram garantir o avanço para ensaios clínicos de fase III nos próximos anos, para a utilização do nitrito de sódio em pacientes com enfarte agudo do miocárdio, mantendo ainda ativo o interesse no potencial terapêutico promissor do nitrito inorgânico (Jones et al., 2014).

Referências

- Bailey, J. C., Feelisch, M., Horowitz, J. D., Frenneaux, M. P. & Madhani, M. (2014). Pharmacology and therapeutic role of inorganic nitrite and nitrate in vasodilatation. *Pharmacology & Therapeutics*, 144(3), 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.06.009>
- Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*, 36(3), 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L. & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *International Agency of Research on Cancer - Lancet Oncology*, 2045(15), 1–2. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)
- Bryan, N. S. (2006). Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(5), 691–701. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.019>
- Bryan, N. S. (2015). The potential use of salivary nitrite as a marker of NO status in humans. *Nitric Oxide*, 45, 4–6. <http://doi.org/10.1016/j.niox.2014.12.011>
- Bueno, M., Wang, J., Mora, A. L. & Gladwin, M. T. (2012). Nitrite signaling in pulmonary hypertension: mechanisms of bioactivation, signaling, and therapeutics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1797–1809. <http://doi.org/10.1089/ars.2012.4833>
- Calvert, J. W. & Lefer, D. J. (2009). Myocardial protection by nitrite. *Cardiovascular Research*, 83(2), 195–203. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvp079>
- Cosby, K., Partovi, K. S., Crawford, J. H., Patel, R. P., Reiter, C. D., Martyr, S. & Gladwin, M. T. (2003). Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Medicine*, 9(12), 1498–1505. <http://doi.org/10.1038/nm954>

- Curtis, E., Hsu, L. L., Noguchi, A. C., Geary, L. & Shiva, S. (2012). Oxygen regulates tissue nitrite metabolism. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(7), 951–961.
<http://doi.org/10.1089/ars.2011.4242>
- Dejam, A., Hunter, C. J., Schechter, A. N. & Gladwin, M. T. (2004). Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32(3), 423–429.
<http://doi.org/10.1016/j.bcmed.2004.02.002>
- Department of Health Statistics and Informatis. (2011). Causes of death 2008 : data sources and methods. *World Health Organization*, 2010(September 2010), 1–28.
Retrieved from
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf
- Dezfulian, C., Raat, N., Shiva, S. & Gladwin, M. T. (2007). Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovascular Research*, 75(2), 327–338. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.05.001>
- Förstermann, U. & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 1–13.
<http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Frank, a., Bonney, M., Bonney, S., Weitzel, L., Koeppen, M. & Eckle, T. (2012). Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 16(3), 123–132.
<http://doi.org/10.1177/1089253211436350>
- Gautier, C., van Faassen, E., Mikula, I., Martasek, P. & Slama-Schwok, A. (2006). Endothelial nitric oxide synthase reduces nitrite anions to NO under anoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(3), 816–821.
<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.031>
- Gilchrist, M., Shore, A. C. & Benjamin, N. (2011). Inorganic nitrate and nitrite and control of blood pressure. *Cardiovascular Research*, 89(3), 492–498.
<http://doi.org/10.1093/cvr/cvq309>

- Gladwin, M. T., Raat, N. J. H., Shiva, S., Dezfulian, C., Hogg, N., Kim-Shapiro, D. B. & Patel, R. P. (2006). Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(5), H2026–H2035. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00407.2006>
- Greer, F. R. & Shannon, M. (2005). Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics*, 116(3), 784–786. <http://doi.org/10.1542/peds.2005-1497>
- Hezel, M. P., Liu, M., Schiffer, T. A., Larsen, F. J., Checa, A., Wheelock, C. E. & Weitzberg, E. (2015). Effects of long-term dietary nitrate supplementation in mice. *Redox Biology*, 5, 234–242. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.004>
- Hord, N. G., Tang, Y. & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic contact for potential health benefits. *Am J Clin Nutr*, 90, 1–10. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131>.INTRODUCTION
- Jansson, E. Å., Huang, L., Malkey, R., Govoni, M., Nihlén, C., Olsson, A. & Lundberg, J. O. (2008). A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nature Chemical Biology*, 4(7), 411–417. <http://doi.org/10.1038/nchembio.92>
- Jensen, F. B. (2009). The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(7), 841–848. <http://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.02.010>
- Jia, G. & Sowers, J. R. (2014). New thoughts in an old player: role of nitrite in the treatment of ischemic revascularization. *Diabetes*, 63(1), 39–41. <http://doi.org/10.2337/db13-1530>
- Jones, D. A., Pellaton, C., Velmurugan, S., Rathod, K. S., Andiapien, M., Antoniou, S. & Ahluwalia, A. (2014). Randomized Phase 2 Trial of Intracoronary Nitrite During Acute Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 116(3), 437–447. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305082>

- Kapil, V., Milsom, A. B., Okorie, M., Maleki-Toyserkani, S., Akram, F., Rehman, F. & Ahluwalia, A. (2010). Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived no. *Hypertension*, 56(2), 274–281.
<http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153536>
- Kapil, V., Weitzberg, E., Lundberg, J. O. & Ahluwalia, A. (2014). Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*, 38, 45–57. <http://doi.org/10.1016/j.niox.2014.03.162>
- Kevil, C. G., Kolluru, G. K., Pattillo, C. B. & Giordano, T. (2011). Inorganic nitrite therapy: Historical perspective and future directions. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 576–593. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.042>
- Kim-Shapiro, D. B., Schechter, A. N. & Gladwin, M. T. (2006). Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), 697–705.
<http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a>
- Kumar, D., Branch, B. G., Pattillo, C. B., Hood, J., Thoma, S., Simpson, S. & Kevil, C. G. (2008). Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7540–5.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0711480105>
- Larsen, F. J., Weitzberg, E., Lundberg, J. O. & Ekblom, B. (2007). Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiologica*, 191(1), 59–66.
<http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01713.x>
- Loscalzo, J. (2013). The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. *Circulation Research*, 113(2), 100–103.
<http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301577>
- Lundberg, J. O., Carlström, M., Larsen, F. J. & Weitzberg, E. (2011). Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovascular Research*, 89(3), 525–532. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvq325>

- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., Ahluwalia, A., Benjamin, N., Bryan, N. S., Butler, A. & Weitzberg, E. (2009). Nitrate and nitrite in biology , nutrition and therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 5(12), 865–869.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E. & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(2), 156–167. <http://doi.org/10.1038/nrd2466-c2>
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Shiva, S. & Gladwin, M. T. (2011). Nitrite and nitrate in human health and disease. *Nutrition and Health*, 21–48. <http://doi.org/10.1007/978-1-60761-616-0>
- Machha, A. & Schechter, A. N. (2011). Dietary nitrite and nitrate: A review of potential mechanisms of cardiovascular benefits. *European Journal of Nutrition*, 50(5), 293–303. <http://doi.org/10.1007/s00394-011-0192-5>
- Milkowski, A., Garg, H. K., Coughlin, J. R. & Bryan, N. S. (2010). Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 22(2), 110–119. <http://doi.org/10.1016/j.niox.2009.08.004>
- Murillo, D., Kamga, C., Mo, L. & Shiva, S. (2011). Nitrite as a mediator of ischemic preconditioning and cytoprotection. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 25(2), 70–80. <http://doi.org/10.1016/j.niox.2011.01.003>
- Omar, S. a., Artime, E. & Webb, A. J. (2012). A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. *Nitric Oxide*, 26(4), 229–240. <http://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.008>
- Omar, S. A., Fok, H., Tilgner, K. D., Nair, A., Hunt, J., Jiang, B. & Webb, A. J. (2015). Paradoxical normoxia-dependent selective actions of inorganic nitrite in human muscular conduit arteries and related selective actions on central blood pressures. *Circulation*, 131(4), 381–389. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009554>

- Park, J. W., Piknova, B., Huang, P. L., Noguchi, C. T. & Schechter, A. N. (2013). Effect of blood nitrite and nitrate levels on murine platelet function. *PLOS ONE*, 8(2), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0055699>
- Pattillo, C. B., Bir, S., Rajaram, V. & Kevil, C. G. (2011). Inorganic nitrite and chronic tissue ischaemia: A novel therapeutic modality for peripheral vascular diseases. *Cardiovascular Research*, 89(3), 533–541. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvq297>
- Perlman, D. H., Bauer, S. M., Ashraffian, H., Bryan, N. S., Garcia-Saura, M. F., Lim, C. C. & Feelisch, M. (2009). Mechanistic insights into nitrite-induced cardioprotection using an integrated metabolomic/proteomic approach. *Circulation Research*, 104(6), 796–804. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.187005>
- Powlson, D. S., Addiscott, T. M., Benjamin, N., Cassman, K. G., de Kok, T. M., van Grinsven, H. & van Kessel, C. (2008). When does nitrate become a risk for humans? *Journal of Environmental Quality*, 37(2), 291–295. <http://doi.org/10.2134/jeq2007.0177>
- Qian, J. & Fulton, D. (2013). Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Frontiers in Physiology*, 4(December), 347. <http://doi.org/10.3389/fphys.2013.00347>
- Sanderson, T. H., Reynolds, C. A., Kumar, R., Przyklenk, K. & Huttemann, M. (2013). Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular Neurobiology*, 47(1), 9–23. <http://doi.org/10.1007/s12035-012-8344-z>
- Shiva, S. & Gladwin, M. T. (2009). Nitrite mediates cytoprotection after ischemia/reperfusion by modulating mitochondrial function. *Basic Research in Cardiology*, 104(2), 113–119. <http://doi.org/10.1007/s00395-009-0009-3>
- Shiva, S., Sack, M. N., Greer, J. J., Duranski, M., Ringwood, L. a, Burwell, L. & Gladwin, M. T. (2007). Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2089–2102. <http://doi.org/10.1084/jem.20070198>

- Sindler, A. L., Devan, A. E., Fleenor, B. S. & Seals, D. R. (2014). Inorganic nitrite supplementation for healthy arterial aging. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 116(5), 463–77.
<http://doi.org/10.1152/jappphysiol.01100.2013>
- Sonoda, K., Ohtake, K., Kubo, Y., Uchida, H., Uchida, M., Natsume, H. & Kobayashi, J. (2014). Aldehyde dehydrogenase 2 partly mediates hypotensive effect of nitrite *Clinical and Experimental Hypertension*, 36(6), 410–418.
<http://doi.org/10.3109/10641963.2013.846355>
- Vitturi, D. A & Patel, R. P. (2011). Current perspectives and challenges in understanding the role of nitrite as an integral player in nitric oxide biology and therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(4), 805–12.
<http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.037>
- Webb, A. J., Patel, N., Loukogeorgakis, S., Okorie, M., Aboud, Z., Misra, S. & Ahluwalia, A. (2008). Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension*, 51(3), 784–790. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523>
- Webb, A., Bond, R., McLean, P., Uppal, R., Benjamin, N. & Ahluwalia, A. (2004). Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), 13683–8.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0402927101>
- World Health Organization. (2013). A global brief on hypertension. 1–39.
- World Health Organization. (2015). IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat and cancer risk. *International Agency of Research on Cancer*, (October), 1–2.
- Yamasaki, H., Watanabe, N. S., Fukuto, J., Cohen, M. F. & Ascorbate, A. (2014). Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: diversity of no production systems. *Studies in Pediatric Disorders*. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-0679-6>

Zhou, L. & Zhu, D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 20(4), 223–230.
<http://doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.001>